



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Avaliação de biomarcadores salivares de estresse oxidativo após meia maratona em corredores amadores

Aluno: Erickson Messias Bezerra dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

UBERLÂNDIA - MG

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Avaliação de biomarcadores salivares de estresse oxidativo após meia maratona em corredores amadores

Erickson Messias Bezerra dos Santos

Orientador: Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

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

Uberlândia - MG
Julho - 2013



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



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237a Santos, Erickson Messias Bezerra dos, 1987-Avaliação de
2013 biomarcadores salivares de estresse oxidativo após meia maratona
em corredores amadores / Erickson Messias Bezerra dos Santos. --
2013. 63 f. : il.

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

1. Bioquímica - Teses. 2. Stress oxidativo. - Teses. I. Botelho,
Françoise Vasconcelos. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Avaliação de biomarcadores salivares de estresse oxidativo após
meia maratona em corredores amadores

ALUNO: Erickson Messias Bezerra dos Santos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Examinadores: Prof. Dr. Nilson Penha Silva (UFU)

Profa. Dra. Verônica Salerno Pinto (UFRJ)

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

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

Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Dedico este trabalho a todos que de alguma maneira contribuíram para a finalização deste ciclo. E em especial a minha família que sempre me apoiou e incentivou em minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela força, discernimento e perseverança concedidos para concluir esta etapa.
- A Maria Carolina ou minha “chefe”, pelos diversos momentos vividos durante esses dois anos.
- A professora doutora Françoise Vasconcelos Botelho, pela orientação durante todo o processo.
- Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos momentos de trabalho, aprendizado e descontração.
- Aos atletas, que possibilitaram essa dissertação.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (INGEB/UFU) por essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Sumário

<i>APRESENTAÇÃO</i>	1
<i>CAPÍTULO 1</i>	4
2 – Formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	5
2.1 – Exercício e estresse oxidativo	8
3 – Saliva: composição, inervação e secreção.....	10
3.1 – Saliva como um fluido para diagnóstico	13
4 – Exercício, saliva e métodos de avaliação do estresse oxidativo.....	15
5 - Referências.....	20
<i>CAPÍTULO 2</i>	25
Resumo	26
1 - Introdução	28
2. Métodos.....	29
2.1 Sujeitos.....	29
2.2 Avaliação da composição corporal	29
2.2 Delineamento experimental	29
2.3 Coleta e processamento da saliva.....	30
2.4 Análises bioquímicas	30
2.4.1 Técnicas de medida de estresse oxidativo.....	30
2.4.2 Dosagem de proteínas	32
2.5 Estatística.....	32
3. Resultados	33
4. Discussão.....	33
5. Conclusão	35
6. Referências.....	36
ANEXOS	46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Alguns mecanismos de defesa antioxidante. Ânions superóxido (O_2^-) são dismutados pela enzima superóxido dismutase em H_2O_2 . Este, por sua vez, sob a ação da enzima catalase, pode ser convertido em $H_2O + O_2$ ou sofrer ação da glutathiona peroxidase (GSH-peroxidase) formando H_2O . A Ferritina pode remover os íons ferro e a vitamina E seqüestra radicais livres impedindo a peroxidação lipídica (LPO).

CAPÍTULO 2

Figura 1. Concentrações salivares de produtos de peroxidação lipídica em atletas amadores antes, após e 24 horas depois de uma meia maratona. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. * Diferenças significativas (Teste de Anova *one way*, $P < 0.05$); $n=11$

Figura 2. Avaliação da atividade antioxidante total da saliva em atletas amadores antes, após e 24 horas depois de uma meia maratona. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. * Diferenças significativas (Teste de Anova *one way*, $P < 0.05$); $n=11$

Figura 3. Concentrações salivares de glutathiona reduzida em atletas amadores antes, após e 24 horas depois de uma meia maratona. Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil. * Diferenças significativas (Teste de Friedman, $P < 0.05$), $n=11$

Figura 4. Avaliação da atividade da enzima catalase em atletas amadores antes, após e 24 horas depois uma meia maratona. Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil. * Diferenças significativas (Teste de Friedman, $P < 0.05$), $n=11$

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Idade, massa, altura, índice de massa corporal (IMC) e percentual de gordura 4 dias antes da prova. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (n=11).

LISTA DE ABREVIATURAS

Km – quilômetros

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

ROS – Espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species)

RNS – Espécies reativas de nitrogênio (reactive nitrogen species)

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

SOD – Superóxido dismutase

Cat – Catalase

GPX – Glutathionaperoxidase

XO – Xantina oxidase

GR – Glutathionaredutase

GST – Glutathione S transferase

ATP – Trifosfato de adenosina

AMP – Monofosfato de adenosina

VO_{2max} – Volume Máximo de oxigênio

slgA - Imunoglobulina A salivar

mg / mL – miligrama por mililitro

mL – Mililitro

g – Gramas

v/v – Volume por volume

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
(Thiobarbituricacidreactivesubstances)

TAC – Capacidade antioxidante total

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

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

RPM – Rotações por minuto

μL – Microlitros

MDA – Malondialdeído

TBA – Ácido tiobarbitúrico

APRESENTAÇÃO

O exercício físico é considerado um agente promotor de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) e a magnitude desse processo é dependente do tipo, duração e intensidade do exercício assim como da condição ou estado de treinamento atual de cada indivíduo.

O aumento da produção de RONS quando não acompanhado de uma resposta antioxidante adequada gera o estresse oxidativo, que é responsável por vários processos celulares, podendo estes ser lesivos às células ou não.

Tais processos oxidativos estão relacionados durante o exercício a uma série de consequências dentre elas a queda na produção de força nos músculos esqueléticos e/ou ainda danos celulares frente a uma demanda de exercício na qual o organismo não foi treinado e/ou adaptado para suportar.

Assim, o monitoramento de marcadores biológicos durante uma temporada de treinamento para que seja possível avaliar, analisar e adequar da melhor maneira possível as cargas de treinamento para atletas profissionais, amadores e recreacionais, faz-se necessário.

O surgimento de análises e coletas de amostras mais rápidas e fáceis, como por exemplo, a coleta da saliva, oferece um futuro promissor para que as análises possam ser aplicadas em campo e sejam mais fidedignas a situações reais, pois poderão ser realizadas onde os atletas treinam e competem, dessa maneira não excluindo toda a atmosfera que envolve o âmbito da competição.

Para que este panorama seja concreto se faz necessários diversos trabalhos em diversos campos da ciência do exercício, para que assim possamos efetivar a aplicação dessas análises onde elas precisam estar, ou seja, nos locais de treinamento e competição.

As corridas de rua vêm se tornando, a cada ano, mais populares e contam com um grande número de atletas amadores. Essas provas longas de maratona e meia maratona são encaradas como desafio e não se sabe ao certo se os atletas possuem o treinamento adequado para suportar tais desafios, que podem desencadear lesões articulares e musculares e também os danos oxidativos.

O presente estudo foi delineado no intuito de examinar alguns marcadores do balanço redox, utilizando a saliva de indivíduos jovens e ativos antes e após uma prova de meia maratona que realizou-se na cidade do Rio de Janeiro.

A apresentação da dissertação foi dividida em capítulos, conforme as normas do Instituto de Genética e Bioquímica e, a formatação seguiu as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT. No capítulo 1, é apresentada uma revisão bibliográfica do assunto, incluindo tópicos referentes às características fisiológicas e metabólicas da prova, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a relação do exercício com a produção e defesa das ERONS, a saliva como um biomarcador para o estresse oxidativo e sua relação com o exercício. No capítulo 2, mostramos os métodos utilizados, os resultados obtidos e a discussão sob a forma de um artigo, que será submetido a uma revista científica indexada.

CAPÍTULO 1

Fundamentação Teórica

1 – Meia maratona: características fisiológicas e metabólicas

A meia maratona é uma corrida com uma distância igual à metade de uma maratona, ou seja, de 21,1 km (21.097,5 metros).

Fisiologicamente essa prova é considerada de resistência, predominantemente aeróbica, dinâmica, intensa, prolongada e exaustiva (COYLE, 1992). O tempo médio da prova de atletas profissionais é de aproximadamente 1 hora no masculino e um pouco mais de 1 hora no feminino.

Considerando a magnitude de tal prova várias capacidades físicas são exigidas do indivíduo para que o organismo consiga manter a atividade muscular e realização da corrida.

Dentre aptidões, destacamos a força e a resistência, que são desenvolvidas e alcançadas pelo treinamento aeróbio crônico. Além disso, também se fazem necessários um adequado aporte e utilização de oxigênio.

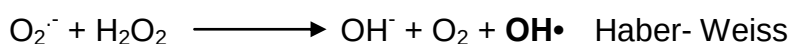
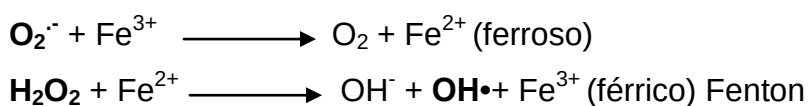
Durante os treinamentos e durante a prova de meia maratona, a demanda energética requer aumento do consumo de oxigênio, que depende do fluxo sanguíneo e da captação de nutrientes e oxigênio. O aumento do fluxo sanguíneo é resultado da elevação de débito cardíaco e da redistribuição do fluxo para a musculatura ativa (COYLE, 1992).

Outro importante fator na manutenção do desempenho é a oxidação dos nutrientes utilizados durante os treinamentos e a prova. Portanto, a capacidade do músculo em produzir energia é dependente da concentração intracelular de mitocôndrias e de substratos como o glicogênio e os triglicerídeos, ou seja, o desempenho dos indivíduos em eventos de resistência depende da capilarização, da musculatura e da atividade oxidativa do músculo (CHARLTON, 1997).

2 – Formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

O oxigênio obtido através da respiração chega às células, às mitocôndrias e, pelo processo de respiração celular é reduzido à água. Estima-se que 0,1 a 4% do oxigênio possa sofrer redução univalente e ser convertido no ânion superóxido

($O_2^{\cdot-}$) através do complexo I e III da cadeia respiratória. O superóxido, uma espécie reativa de oxigênio, através da superóxido dismutase (SOD), pode ser convertido a outra espécie reativa de oxigênio, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MORÁN *et al.*, 2012). Este, embora não seja um radical livre, reage com átomos de Fe^{+2} formando o radical hidroxila ($OH\cdot$) através da reação de Fenton (BARJA, 1999; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1984). O superóxido pode reduzir o Fe^{+3} a Fe^{+2} facilitando a produção do radical hidroxila ($OH\cdot$). O conjunto de reações entre o peróxido de hidrogênio, superóxido e ferro é chamada reação de Haber-Weiss (STOHS E BAGCHI, 1995) - esquema abaixo:



Outras formas de produção de espécies reativas de oxigênio a partir do oxigênio incluem a formação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) através da enzima xantina oxidase (ZWEIER *et al.*, 1988). As espécies reativas de oxigênio também são produzidas através da oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos, metabolização de xenobióticos por enzimas microssomais P450 (BECKMAN E AMES, 1998), leucócitos (contra microorganismos invasores) (SEGAL, 2005), ciclooxigenases, lipoxigenases, hemoglobina, mioglobina, epinefrina, dopamina e de açúcares (HERMES-LIMA, 2004)

As espécies reativas de oxigênio são altamente reativas e capazes de reagir como várias biomoléculas, causando danos a lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA, processo conhecido como estresse oxidativo (KREGEL e ZHANG, 2007).

Devido ao potencial danoso dos radicais livres, o organismo possui inúmeros mecanismos de defesa contra a formação das ROS, essas defesas têm a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Elas são divididas em enzimáticas

(Figura 1) e não enzimáticas (BARBOSA, 2010). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (Cat) e Glutathionaperoxidase (GPx). Essas enzimas tem como função prevenir os danos oxidativos, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). O sistema de defesa não-enzimático inclui, os compostos antioxidantes de origem dietética, como o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes (PRASAD *et al.* 2007). A glutathiona, um tripeptídeo formado no fígado, é considerado o principal antioxidante não enzimático das fibras musculares. Tem como funções servir de substrato para a enzima GPX eliminar H_2O_2 , reagir diretamente com alguns radicais e também na redução de outros antioxidantes, como por exemplo, a vitamina E (POWERS e JACKSON, 2008).

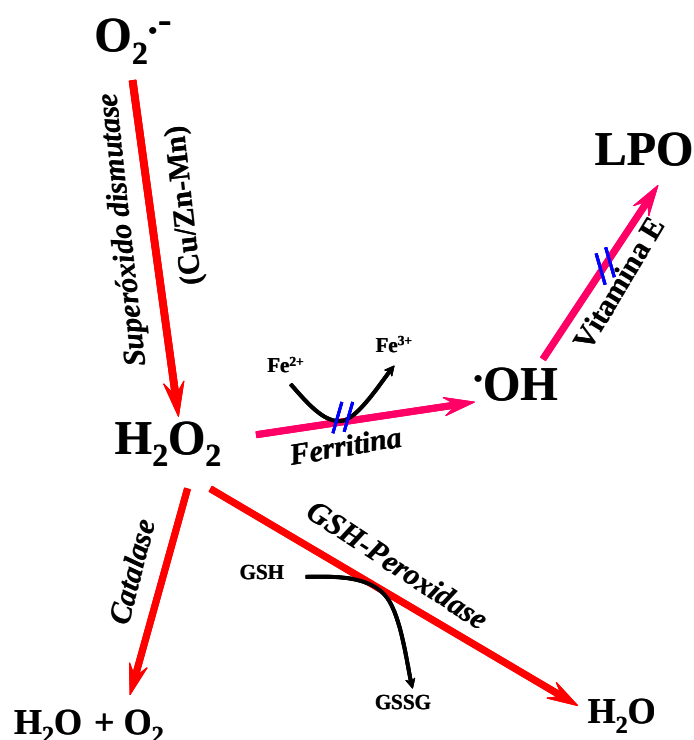


Figura 1. Alguns mecanismos de defesa antioxidantes. Ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) são dismutados pela enzima superóxido dismutase em H_2O_2 . Este, por sua vez, sob a ação da enzima catalase, pode ser convertido em $H_2O + O_2$ ou sofrer ação da glutathionaperoxidase (GSH-peroxidase) formando H_2O . A Ferritina pode remover os íons ferro e a vitamina E sequestra radicais livres impedindo a peroxidação lipídica (LPO).

O estresse oxidativo é definido como sendo o desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, favorecendo a geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos podendo desencadear danos irreversíveis e até mesmo morte celular (HALLIWELL e WHITEMAN, 2000).

2.1 – Exercício e estresse oxidativo

A prática regular de atividades físicas associadas a uma dieta balanceada é um importante fator na promoção da saúde. Todavia, a freqüente realização de exercícios físicos de alta intensidade ou exaustivos podem aumentar a suscetibilidade às lesões, promover a fadiga crônica e overtraining, parcialmente em razão da elevada síntese de ROS (CRUZAT *et al.* 2007).

Evidências experimentais apontam que estes compostos podem estar envolvidos com o desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, doenças inflamatórias e aterosclerose. Por outro lado, as ROS também podem ter efeitos considerados positivos sobre o sistema imune e exercer funções metabólicas essenciais para a homeostasia celular. Além disso, diversas alternativas nutricionais têm surgido na tentativa de reduzir o estresse oxidativo e melhorar o desempenho atlético (CRUZAT *et al.* 2007).

Durante o exercício o consumo e a captação total de oxigênio são aumentados em resposta ao aumento da intensidade do exercício (HALLIWELL, 1989). Tais alterações no metabolismo de oxigênio favorecem a geração de radicais livres e/ou espécies reativas não-radicalares. A atividade física intensa é capaz de gerar as espécies em questão, por meio da ativação de vários mecanismos: atividade da xantina oxidase, produção mitocondrial, citoplasmática e favorecida pelos íons ferro e cobre (KOURY *et al.* 2003).

A fosforilação oxidativa aumenta em resposta ao exercício, este aumento também é acompanhado do aumento dos radicais livres. As catecolaminas que

também são liberadas durante o exercício podem levar a produção de radicais livres. Outras fontes de radicais livres aumentam com o exercício, incluindo a xantina oxidase, devido a eventos de isquemia e reperfusão, NADPH oxidase, e algumas fontes secundárias, como, a liberação de radicais pelo recrutamento de macrófagos para reparação de tecidos lesados (URSO e CLARKSON, 2003 apud JACKSON, 2000).

Os eventos isquêmicos aumentam o catabolismo das purinas, ou seja, o ATP em uma alta demanda de trabalho muscular é degradado até AMP, uma vez que a disponibilidade de oxigênio esteja baixa durante o processo isquêmico o AMP é continuamente degradado a hipoxantina, que é convertida a xantina e, posteriormente, a ácido úrico pela enzima xantina-oxidase, juntamente com a redução do oxigênio, produzindo radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CRUZAT *et al.* 2007).

Por outro lado, o exercício promove uma resposta adaptativa que faz com que as espécies reativas geradas tenham uma ação de sinalizadores celulares capazes de ativar vias de regulação de genes relacionados à expressão de enzimas e proteínas específicas responsáveis por manter o equilíbrio intracelular entre oxidantes e antioxidantes (SOUZA *et al.* 2005).

Segundo Finkel e Holbrook (2000), a estratégia mais eficiente em aumentar a quantidade endógena de antioxidantes pode ser a maior indução do próprio estresse oxidativo, que, gradativamente, estimularia os mecanismos antioxidantes celulares e aumentaria a resistência a lesões induzidas pelo exercício.

Alguns trabalhos relacionando intensidade do exercício mostram que intensidades $\geq 70\%$ do consumo máximo de oxigênio $\text{VO}_{2\text{máx}}$, aumentam a síntese de ROS (JI, 2002). Ji *et al.* (2007) demonstraram que, agudamente, o músculo esquelético submetido a uma carga isolada de trabalho exaustivo produzia aumento da peroxidação lipídica (PL) e estimulava a atividade de diversas enzimas antioxidantes como a glutathiona-peroxidase (GPx), superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT).

Souza *et al.* (2005) mostraram o efeito da atividade física intensa sobre marcadores do estresse oxidativo, comparado ao repouso. Estes autores mostraram que a corrida de alta intensidade até a exaustão em esteira rolante

determinou aumento nos níveis plasmáticos de malondialdeído, principalmente decorridos 23 e 26 minutos.

Burneikoet *al.* (2006) estudaram, em ratos Wistar, o efeito da atividade física, natação, sobre o estresse oxidativo. Os ratos foram distribuídos em três grupos (n=8): sedentário (S), praticantes de atividade física por dois dias/semana (AT2) e cinco dias/semana (AT5). Após oito semanas de experimentação, independentemente da frequência de realização da atividade física, o grupo dos ratos ativos mostrou maiores níveis séricos totais de substâncias antioxidantes.

Portanto o estresse oxidativo é um acontecimento normal no metabolismo aeróbio, este fenômeno tende a aumentar quando praticamos uma atividade física seja ela aeróbica ou anaeróbica, mas a exposição a esta possível “agressão” ao organismo leva ao aumento das respostas antioxidantes e também a um aumento da resistência a novos estresses, fato chamado de adaptação ao treinamento.

Os músculos esqueléticos também geram constantemente ROS e incluem um amplo espectro de espécies radicalares, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O músculo esquelético também produz radical óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), pela reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase, a partir do aminoácido arginina. O $NO^{\cdot}$, por sua vez, pode reagir com $O_2^{\cdot-}$. Formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um intermediário instável, de alta reatividade (GANDRA *et al.* 2004).

3 – Saliva: composição, inervação e secreção

A saliva é um produto da secreção de três pares principais de glândulas salivares, as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais, mas também da secreção de numerosas glândulas salivares menores, presentes na mucosa da língua, bochechas, lábios e palato (SCHIPPER *et al.*, 2007). Assim como outros fluídos das mucosas, a saliva forma uma camada móvel na superfície da mucosa oral e contém arranjos de componentes que desempenham importantes funções (PROCTOR e CARPENTER, 2007). Este fluido constantemente banha os dentes e as mucosas orais, atuando como solução de limpeza, reservatório de íons, lubrificante e tampão (BATTINO *et al.*, 2002).

Segundo Mese e Matsuo (2007), a saliva é essencial para a função adequada do corpo. Esse líquido ajuda a amolecer alimentos, formando um bolo alimentar que auxilia na deglutição, além de limpar os tecidos orais e proteger os dentes contra danos. Além disso, a saliva contém enzimas digestivas (amilase e lipase) e receptores que permitem a percepção do sabor dos alimentos e de outras substâncias. Ainda de acordo com esses autores, pequenas proteínas como a imunoglobulina A (IgA), histaminas e citocinas, além de fatores de crescimento, hormônios, mucinas e outros componentes salivares, podem desempenhar um papel na manutenção da imunidade inata e na defesa das superfícies da mucosa oral. Por fim, a saliva protege o trato gastrointestinal superior por tamponamento do refluxo ácido, em casos de regurgitação e protege os dentes por promover a remineralização trazendo minerais essenciais a superfície do esmalte, o que aumenta a captação mineral no esmalte desmineralizado.

Segundo Battino *et al.* (2002) a saliva pode ser descrita como um fluido heterogêneo, composto por proteínas, glicoproteínas, eletrólitos e moléculas orgânicas menores, além de componentes transportados a partir do sangue. As proteínas da saliva (1-2 mg / mL) são constituídas principalmente por glicoproteínas, enzimas (por exemplo alfa-amilase, a anidrase carbônica), imunoglobulinas, e uma vasta gama de peptídeos com atividade antimicrobiana. A fração inorgânica da saliva contém os eletrólitos usuais dos fluidos corporais, mas em diferentes concentrações, o que torna a saliva um fluido hipotônico (SCHIPPER *et al.*, 2007). Os constituintes inorgânicos da saliva são principalmente Na^+ , Cl^- , HCO_3^- e K^+ e em menor quantidade Ca^{2+} , Mg^{2+} e fosfato (MESE e MATSUO, 2007).

A maioria dos componentes da saliva - água, íons, proteínas - são ativamente secretados pelas glândulas salivares. A peça secretória final das glândulas salivares consiste em unidades acinares secretórias, as quais são responsáveis por sintetizar e secretar a maioria dos componentes protéicos funcionalmente importantes da saliva. Os ácinos são especializados para cada glândula e são classificados de modo a refletir as proteínas secretadas por cada tipo de ácino - as glândulas parótidas têm principalmente células serosas, as

glândulas sublinguais, principalmente células mucosas e as glândulas submandibulares, ambos (PROCTOR e CARPENTER, 2007).

Segundo Mese e Matsuo (2007), a secreção salivar é exclusivamente controlada pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. De acordo com esses autores, geralmente, não é necessário estímulo hormonal para o início da secreção deste fluido. A inervação parassimpática é responsável principalmente pela secreção de água e eletrólitos, enquanto a inervação simpática está relacionada com a secreção de proteínas, acompanhada pela exocitose em células acinares. Complementando, Proctor e Carpenter (2007), afirmaram que a secreção salivar é um reflexo mediado por inervação autonômica e quando há interrupção dessa inervação, particularmente da inervação autonômica parassimpática, a secreção deste fluido na maioria das glândulas, cessa quase que completamente. Ainda segundo esses autores, há algumas poucas glândulas salivares que mantêm uma secreção espontânea na ausência de um estímulo mediado por inervação, mas até mesmo nessas glândulas, uma taxa normal de secreção requer inervação autonômica intacta.

A integração entre os impulsos dos centros salivares primários e as glândulas depende de modulação central. O arco reflexo sensorial consiste de neurônios aferentes, neurônios retransmissores, que levam os impulsos até os centros salivatórios simpáticos e parassimpáticos, fibras eferentes dos centros salivatórios e células ganglionares autonômicas que inervam as glândulas salivares. Estímulos aferentes são integrados nos centros primários salivares de medula. Nervos autonômicos parassimpáticos eferentes conduzem o sinal até as glândulas salivares por meio de gânglios parassimpáticos, situados próximos à glândula alvo. A inervação é projetada a partir da medula até o centro simpático localizado nos segmentos torácicos superiores da medula espinal, e a partir daí nervos eferentes simpáticos conduzem o sinal até as glândulas salivares via gânglios cervicais. A partir do córtex até os centros parassimpáticos há projeções nervosas e essas podem ter efeitos excitatórios ou inibitórios sobre a secreção salivar. Nervos eferentes autonômicos estimulam a secreção salivar e não há inibição desta, por meio de nervos simpáticos (PROCTOR e CARPENTER, 2007).

A sinalização celular para o aumento da secreção salivar parece estar relacionada ao aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} . De acordo com Mese e

Matsuo (2007), o aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular, iniciado por estimulação parassimpática, leva a abertura de canais de Cl^- na membrana apical, o que promove a secreção de Cl^- no lúmen. A eletronegatividade devida à secreção de Cl^- transporta Na^+ através das junções comunicantes permeáveis a cátions entre as células acinares para preservar a neutralidade. A secreção líquida de NaCl cria um gradiente osmótico através dos ácinos, o que extrai água a partir da corrente sanguínea por meio das junções comunicantes. Assim, a saliva secretada no lúmen (saliva primária) é um fluido isotônico semelhante ao plasma. Na próxima etapa, a composição da saliva primária é modificada no sistema ductal (hipótese de 2 etapas), processo no qual os ductos intralobulares reabsorvem Na^+ e Cl^- , mas não água, o que torna a saliva final um fluido hipotônico.

As glândulas salivares fornecem um fluxo basal de saliva na boca, que permite uma ação protetora na cavidade oral. Entretanto, durante curtos períodos, nos quais há estímulos evidentes proporcionados pelo cheiro, pelo sabor e pela mastigação dos alimentos, ocorre um aumento considerável do fluxo, em relação à quantidade basal. Esses reflexos salivares ao gosto, à mastigação e a outros fatores são devidos à presença de vários receptores incluindo receptores gustatórios, mecanoreceptores, receptores olfatórios e nociceptores. Não só o volume, mas também a composição da saliva na cavidade oral pode variar dependendo da contribuição das diferentes glândulas durante esses estímulos. Por exemplo, a glândula parótida tem uma taxa de secreção basal muito baixa (sem estimulação), comparada ao período de estimulação. Em contraste, as glândulas submandibular e sublingual secretam relativamente mais saliva em condições sem estimulação. Isso demonstra que diferentes estímulos aferentes podem alterar a composição da saliva secretada pelas glândulas (PROCTOR e CARPENTER, 2007).

3.1 – Saliva como um fluido para diagnóstico

A saliva representa uma atrativa ferramenta para o monitoramento e para o diagnóstico precoce de doenças orais. De acordo com Miricescu *et al.* (2011), esse fluido contém substâncias produzidas localmente, assim como outras

moléculas derivadas da circulação sistêmica, como produtos do soro, fluido crevicular gengival, eletrólitos, microorganismos dentre outras substâncias e, até mesmo marcadores para doenças hormonais, infecciosas e imunológicas podem ser determinados na saliva. Dessa forma, a cavidade oral pode ser uma ferramenta alternativa não só para o monitoramento da saúde oral, mas também da saúde sistêmica.

Segundo Lee *et al.* (2009), as barreiras para a implementação generalizada de diagnóstico por meio da saliva para permitir a detecção de doenças múltiplas estão sendo amplamente superadas. De acordo com esses autores, técnicas estão surgindo a partir de uma combinação de tecnologias de miniaturização e descobertas em diversos campos da biologia, química, física e engenharia, levando a alta taxa de transferência, automatização, baixo custo e análises bioquímicas mais eficientes e rápidas, o que permite o desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico com pequenas quantidades de fluidos corporais, que poderão refletir o estado de saúde do paciente.

Para Kamodyová e Celec (2011), as principais vantagens da saliva, em relação ao sangue referem-se à coleta simples, segura e não invasiva, além da possibilidade de um monitoramento longitudinal com número maior de amostras e maior diversidade populacional, incluindo crianças e pessoas idosas, por exemplo. Uma grande desvantagem de se utilizar saliva como um fluido de diagnóstico, entretanto, é o fato de que os analitos informativos estão geralmente presentes em quantidades inferiores, na saliva do que no soro. Em relação a essa desvantagem, com técnicas novas e extremamente sensíveis as quais vêm sendo desenvolvidas atualmente, o nível mais baixo de analitos na saliva já não é uma limitação. Atualmente, quase tudo que se pode medir no sangue, pode também ser dosado na saliva. A saliva tem sido utilizada para detectar o vírus HIV e a hepatite viral, além de poder ser utilizada para monitorar uma variedade de drogas, incluindo maconha, cocaína e álcool (LEE *et al.*, 2011).

Muito importante para as análises realizadas na saliva é a padronização da coleta, para que a mesma possa ganhar maior aceitação como um fluido diagnóstico. Existem várias possibilidades para a coleta de amostras salivares, sendo o padrão ouro atual, segundo Celec e Ostatníková (2012), a coleta da saliva não estimulada, por meio de cuspe em tubos específicos. Ainda de acordo

com esses autores para tornar a coleta mais rápida e fácil, a salivação pode ser induzida pela utilização de ácido cítrico ou ingredientes alimentares com sabor doce. Entretanto, a salivação induzida pode alterar as concentrações dos analitos na saliva e deve, portanto, ser utilizada com precaução.

Segundo Kammdyová e Celec, (2011) além da coleta passiva, estimulada ou não estimulada, a saliva pode ser coletada utilizando-se dispositivos comerciais, como por exemplo, o sistema de salivete tradicional com um cotonete revestido com algodão e o sistema de salivete cortisol (utilizado para análise de glicocorticóides e drogas terapêuticas) com um cotonete de polipropileno. As vantagens da coleta com salivete em relação ao cuspe são a facilidade e a higiene, uma vez que esse tipo de coleta reduz a viscosidade da saliva e remove células mortas, glicoproteínas e outras substâncias subcelulares. Entretanto, a saliva coletada por meio de salivetes difere da saliva total não estimulada, pois pode sofrer alterações na sua composição incluindo mudanças nas concentrações iônicas, na atividade de várias enzimas e nos níveis hormonais e protéicos. Alguns estudos indicam que pelo menos os níveis de esteróides são afetados pelo sistema de coleta por salivete, sendo este dispositivo não remendado para esse tipo de análise (KAMMDYOVÁ e CELEC, 2011; CELEC e OSTATNÍKOVÁ 2012).

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

4 –Exercício, saliva e métodos de avaliação do estresse oxidativo

O exercício físico regular tem muitos benefícios para a saúde incluindo prevenção contra todas as causas de mortalidade advindas de doenças crônicas degenerativas como, doenças cardiovasculares, câncer, obesidade e diabetes. (POWERS e JACKSON, 2008).

Nas últimas décadas cresce o número de trabalhos envolvendo o desbalanço redox e seus efeitos, as espécies produzidas, o aprimoramento das defesas antioxidantes e as técnicas laboratoriais para a detecção dessas espécies. Assim como a influência do exercício de diferentes tipos, intensidades e volumes nesses marcadores.

O fluido corporal geralmente utilizado para tais análises é o sangue, mas ultimamente cresce o interesse na saliva por apresentar algumas vantagens frente ao sangue. Como por exemplo, o simples, não invasivo e seguro processo de coleta, a possibilidade de um monitoramento longitudinal e com repetidas coletas e também a ampla aplicação de crianças a idosos (KOHLENER *et al.* 2008).

A saliva é rica em antioxidantes, principalmente ácido úrico, com contribuições menores de ascorbato, albumina e glutathione (BATTINO *et al.* 2002), e demonstrou-se que a saliva tem um papel na supressão da peroxidação lipídica dos alimentos ingeridos (TERAO e NAGAO, 1991).

Portanto a saliva é um fluido que pode ser usado para o diagnóstico de várias doenças orais, assim como para avaliação do balanço redox em situações não patológicas e patológicas (MIRICESCU *et al.* 2011).

Estudos mostram que várias análises de estresse oxidativo podem ser feitas na saliva entre elas estão avaliação da peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total, atividades enzimáticas e dosagens de antioxidantes não enzimáticos como ácido úrico e glutathione.

Um método bastante utilizado é a dosagem dos produtos da peroxidação lipídica pelo TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) que utiliza o malonaldeído como padrão (KAMODYOVÁ e CELEC, 2011; DEMINICE *et al.*, 2010). O método FOX também é utilizado para avaliar a peroxidação lipídica através da oxidação do ferro do estado ferroso para férrico usando peróxido de hidrogênio como padrão (GONZÁLES *et al.*, 2008; ZAMBRANO *et al.*, 2009). A avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) da saliva inclui todos os antioxidantes salivares, esta técnica vem sendo bastante utilizada uma vez que a avaliação de cada antioxidante ficaria mais cara e impossibilitaria a aplicação em análises clínicas pela demanda de tempo.

Segundo Prior e Cao (1999) a CAT pode ser determinada no sangue por três técnicas bioquímicas: a) ensaio espectrofotométrico; b) ensaio de quimiluminescência; c) voltametria cíclica.

Várias técnicas foram desenvolvidas para a medição da CAT de fluidos e todos são essencialmente métodos de inibição: um radical livre é gerado, existe uma extremidade através do qual a presença do radical é detectada, e o CAT do fluido adicionado inibe o ponto final por limpeza do radical livre. O ensaio espectrofotométrico também é denominado "Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox" (CAET) (BATTINO *et al.* 2002).

Outro método para a medição da atividade antioxidante salivar é baseado em ensaios por quimiluminescência (CHAPPLE *et al.* 1997, HIRAYAMA *et al.* 1997, HIRAYAMA e YIDA 1997 *apud* BATTINO *et al.* 2002). Um ensaio de quimiluminescência aumentada baseia-se na enzima peroxidase de rábano (HRP)- catalisando a oxidação do luminol por H_2O_2 (CHAPPLE *et al.* 1997). A luz produzida a partir da reação é aumentada pela p-iodofenol, que prolonga e intensifica o sinal de luz. O sinal resultante pode ser temporariamente suprimido por antioxidantes. Tal supressão dura até os antioxidantes serem esgotados. A capacidade antioxidante da solução sob teste pode ser calculada a partir de uma curva padrão executada com um calibrador (BATTINO *et al.* 2002).

O segundo método de quimiluminescência baseia-se na extinção dependente de antioxidante gerado a partir de hidroperóxidos lipídicos e o reagente isoluminol/microperoxidase. Quando um antioxidante está presente na mistura de ensaio, ele recolhe o oxiradical lipídico e reduz a produção de luz (HIRAYAMA *et al.* 1997 *apud* BATTINO *et al.* 2002)

O terceiro método baseia-se na geração de $\text{OH}\cdot$ pela reação de Fenton e sua subsequente determinação por quimiluminescência. Este simples, sensível e útil método avalia a capacidade de oxidar $\text{OH}\cdot$ de fluidos biológicos tais como a saliva (HIRAYAMA *et al.*, 1997 *apud* BATTINO *et al.* 2002).

Outro método para a medição atividade antioxidante salivar parece ser o menos difundido e requer o uso da técnica de voltametria cíclica (KOHEN *et al.* 1999). O método foi concebido para avaliar CAT salivar, tendo em conta que os principais eliminadores de radicais livres na saliva são moléculas com propriedades de redução.

O procedimento de voltametria cíclica (BATTINO *et al.* 2002) avalia o poder redutor geral dos antioxidantes de baixo peso molecular na saliva. Seguido a preparação, a amostra é colocada numa “célula” com 3 eletrodos de trabalho: o (por exemplo, carbono vítreo), a referência (Ag / AgCl) e do auxiliar (fio de platina). A aplicação de um potencial constante de velocidade para o eletrodo de trabalho quer em direção o potencial positivo (para avaliar redutores equivalentes) ou para o eletrodo negativo (para avaliar as espécies oxidantes), permite a gravação de uma curva de corrente ou potencia “voltamograma cíclico” (BATTINO *et al.* 2002)

A atividade das enzimas antioxidantes também pode ser mensurada utilizando testes colorimétricos por espectrofotometria. Entre as enzimas mais estudadas podemos citar: catalase (Cat), superóxido desmutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e xantina oxidase (OX).

A catalase tem várias funções bioquímicas, mas o principal objetivo da catalase é catalisar a quebra de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Ela possui uma massa molecular de 240k Da e é distribuída extensamente no interior da célula. O ferro é um co-fator obrigatório ligado ao sítio ativo da enzima (Powers e Jackson, 2008). Embora CAT e GPX compartilhem substratos comuns, CAT tem uma afinidade muito menor para a H_2O_2 em concentrações baixas em comparação com GPX (POWERS e JACKSON, 2008).

A superóxido dismutase (SOD) foi descoberta em 1969 por McCord e Fridovich e forma a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido. A SOD catalisa a oxidação de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Em mamíferos, existem três isoformas de SOD (SOD1, SOD2, SOD3), e todas exigem um metal de transição no centro ativo catalítico para realizar a reação de oxidação do ânion superóxido (POWERS e JACKSON, 2008).

As isoformas das enzimas GPX catalisam a redução de H_2O_2 ou hidroperóxido orgânico (ROOH) a água (H_2O) e álcool (ROH), respectivamente, utilizando glutathione reduzida (GSH) ou, em alguns casos, tioredoxina ou glutathione como o doador de elétrons. Quando é o GSH doador de elétrons, doa um par de íons de hidrogênio e de GSH é oxidado em glutathione dissulfeto (GSSG) (POWERS e JACKSON, 2008).

A enzima xantina oxidase catalisa uma série de reações que levam a conversão de hipoxantina a ácido úrico. Sobre condições normais 80-90% da XO existe na forma desidrogenase, que utiliza NAD^+ como aceptor de elétrons. No entanto, durante o exercício, ela é convertida para forma oxidase e nessa forma ela utiliza o oxigênio ao invés de NAD como aceptor de elétrons (KNEZ *et al.* 2006).

Outras técnicas utilizadas para a avaliação do perfil redox dos fluidos e a quantificação de antioxidantes não enzimáticos como ácido úrico e glutathiona.

O ácido úrico é o antioxidante mais encontrado na saliva, a maioria dos trabalhos utiliza kits comerciais para a realização desta dosagem (GONZÁLES *et al.* 2008; ZAMBRANO *et al.* 2009). A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo tiol antioxidante (γ -glutamilcisteinil-glicina) e suas concentrações intracelulares é um indicador de estresse oxidativo. Dentro das células, a GSH existe em duas formas diferentes: a forma sulfidril glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) (RAHMAN *et al.* 2006).

O estresse oxidativo tem um profundo efeito sobre o equilíbrio celular tiol e pode levar a uma diminuição da razão de GSH / GSSG em muitos órgãos. Espécies reativas de oxigênio ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos xenobióticos e outros radicais orgânicos são neutralizados por GSH em uma cascata de desintoxicação que envolve a glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-S-transferases (GST) e glutathiona redutase (GR) (RAHMAN *et al.* 2006).

Portanto a aplicação da saliva em situações clínicas como auxiliar de diagnóstico está sendo ampliada, uma vez que, vários métodos foram desenvolvidos para avaliar o perfil redox da saliva, o que indica um aumento do interesse dos pesquisadores (MANDEL, 1990).

5 - Referências

- BARBOSA KBF, COSTA NMB, ALFENAS RCG, DE PAULA SO, MINIM VPG, BRESSAN J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas. 2010; 23(4):629-643. *Apud* BURNEIKO RCM, DINIZ YS, GALHARDI CM, RODRIGUES HG, EBAID GM, FAINE LA, *et al.* Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol.** 2006; 44(7):1167-72.
- BARJA G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. **J Bioenerg Biomembr.** 1999; 31: 347-66.
- BATTINO M, FERREIRO MS, GALLARDO I, NEWMAN HN, BULLON P. The antioxidant capacity of saliva. **J Clin Periodontol.** 2002; 29(3):189-94.
- BECKMAN KB, AMES BN. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev.** 1998; 78: 547-581
- BRNSARD K, KRAUSE KH. The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev.** 2007; 87(1):245-313.
- BURNEIKO RCM, DINIZ YS, GALHARDI CM, RODRIGUES HG, EBAID LA, PADOVANI CR, *et al.* Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol.** 2006; 44(7):1167-72.
- CELEC, P; OSTATNÍKOVÁ, D. Saliva collection devices affect sex steroid concentrations. **Clin Chim Acta.** 2012; 413:1625-8.
- CHARLTON GA, CRAWFORD MH. Physiologic consequences of training. **Cardiol Clin.** 1997; 15:345-54.
- COSTA, C.M.; SANTOS, R.C.; LIMA, E.S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **J Bras Patol Med Lab.** 2006; 42:345-50.
- COYLE EF. Physiological determinants of endurance exercise performance. **J Sci Med Sport.** 1992; 2:181-9.

CRUZAT ML; ROGERO MM; BORGES MCB; Tirapegui J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Rev Bras Med Esporte**. 2007; 13.

DEMINICE R, SICCHIERI T, PAYÃO PO, JORDÃO AA. Blood and Salivary Oxidative Stress Biomarkers Following an Acute Session of Resistance Exercise in Humans. **Int J Sports Med** 2010; 31: 599.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**. 1997; 43(1):61-8.

FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**.2000;408:239-47.

GANDRA PG; ALVES AA; MACEDO DV. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Quim. Nova**, 2004; 27: 980-985.

GONZÁLEZ, D.; MARQUINA, R.; RONDÓN, N. Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. **Research in Sports Medicine**, 2008; 16: 128-137.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J**. 1984; 219:1-14.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radical in biology and medicine. 2nd ed. New York: **Oxford University Press**; 1989.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. 2004; 142(2): 231-55.

HARBER MP, KONOPKA AR, UNDEM MK, HINKLEY JM, MINCHEV K, KAMINSKY LA, TRAPPE TA, TRAPPE S. Aerobic exercise training induces skeletal muscle hypertrophy and age-dependent adaptations in myofiber function in young and older men. **J Appl Physiol** 2012;113: 1495–1504.

HERMES-LIMA M. Oxygen in biology and biochemistry role of free radicals. In: STOREY KB. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**, Hoboken, New Jersey, Wiley-Liss. 2004; 319-368.

JI LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 1999; 222: 283-292.

JI LL. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. **Ann NY Acad Sci.** 2002; 959:82-92.

KAMODYOVÁ N, CELEC P. Salivary markers of oxidative stress and Salivette collection systems. **Clin Chem Lab Med.** 2011; 49(11):1887-90.

KNEZ, L.W.; COOMBES, J.S.; DAVID G. JENKINS, D.G. Ultra-Endurance Exercise and Oxidative Damage. **Sports Med.** 2006; 36 (6).

KOHEN, R., BEIT-YANNAI, E., BERRY, E. M. & TIROSH, O. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. **Methods in Enzymology.** 1999;300: 285–296.

KOURY JC, DONANGELO CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.** 2003; 16(4):433-41.

KREGEL KC, ZHANG HJ. An integred view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerantions. **Am J Physiol-Reg I.** 2004; 279, R18-R36.

KUPPUSAMY P, ZWEIER JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase: evidence for hydroxyl radical generation. **J Biol Chem** 1989; 264 (17).

LEE JM, GARON E, WONG DT. Salivary diagnostics. **Orthod Craniofac Res.** 2009; 12(3):206-11.

MANDEL ID. The diagnostic uses of saliva. **Journal of Oral Pathology Medicine.** 1990, 19, 119-125 *apud* BATTINO M, FERREIRO MS, GALLARDO I, NEWMAN HN, BULLON P. The antioxidant capacity of saliva. **J Clin Periodontol.** 2002; 29 (3): 189-94.

MESE H, MATSUO R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. **J Oral Rehabil.** 2007; 34(10):711-23.

MIRICESCU, D.; GREABU, M.; TOTAN, A., DIDILESCU, A. RADULESCO, R. The antioxidant potential of saliva: clinical significance in oral diseases. **Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology.** 2011; (2), 139-43.

MORÁN M, LASTRES DM, BUERA LM, ARENAS J, MARTÍN MA, UGALDE C. Mitochondrial respiratory chain dysfunction: Implications in neurodegeneration. **Free Radical Biology and Medicine.** 2012; 53: 595–609.

POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. **Physiol Ver.** 2008; 88: 1243-1276.

PRASAD AS, BECK FWJ, BAO B, FITZGERALD JT, SNELL DC, STEINBERG JD, *et al.* Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **Am J Clin Nutr.** 2007; 85(3): 837-44.

PRIOR, R. L. & CAO, G. (1999) In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine.** 1999;27: 1173–1181.

PROCTOR GB, CARPENTER GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. **Auton Neurosci.** 2007;30;133(1):3-18.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method **Nature Protocols.** 2006; 1 NO.6.

SCHIPPER, RG.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. **Arch Oral Biol.** 2007; 52(12):1114-35.

SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME.** 2004; 10(10):308-13.

SEGAL AW. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol.** 2005; 23, 197-223.

SMOLKA, M. B.; ZOPPI, C. C.; ALVES, A. A.; SILVEIRA L. R.; MARANGONI, S.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, D.V.; **Am. J. Physiol. Regul.Integr. Comp. Physiol.** 2000; 279: R1539.

STOHS SJ, BAGCHI D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radic Biol and Med.** 1995; 18: 321-336.

SOUZA JR TP, OLIVEIRA PR, PEREIRA B. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. **RBME.** 2005; 11(1):91-6.

TERAO, J. & NAGAO, A. Antioxidative effect of human saliva on lipid peroxidation. **Agricultural Biological Chemistry.** 1991. 55, 869–872 *apud* BATTINO M, FERREIRO MS, GALLARDO I, NEWMAN HN, BULLON P. The antioxidant capacity of saliva. **J Clin Periodontol.** 2002; (3):189-94.

URSO M.L, CLARKSON P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** 189 (2003) 41_/54 *apud* JACKSON, M.J., 2000. In: Hanninen, O., Packer, L., Sen, C.K. (Eds.), **Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise.** Elsevier, Amsterdam, pp. 57_/68.

ZAMBRANO, J. C.; MARQUINA, R.; RONDÓN, N. Aerobic Exercise reduced oxidative stress in saliva of persons with down syndrome. **Research in Sports Medicine,** 2009; 17:195-203.

ZWEIER JK, KUPPUSAMY P, LUTTY GA. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. **Proc Natl Acad Usci U S A.** 1988; 85: 4046-4050.

CAPÍTULO 2

Avaliação de biomarcadores salivares de estresse oxidativo após meia maratona em corredores amadores

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

Erickson M. B. Santos^a, Marcelo Costa Júnior ^a, Maria Carolina Siqueira ^a, Miguel M. Diaz ^a, Foued Salmen Espindola ^a, Françoise Vasconcelos Botelho^a

^aInstituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brasil

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

Resumo

O exercício físico é considerado um agente promotor de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS); a magnitude desse processo é dependente do tipo, duração e intensidade do exercício. O surgimento de análises e coletas de amostras mais rápidas e fáceis, como por exemplo, a coleta da saliva, oferece um futuro promissor para que as análises possam ser aplicadas em campo para quantificar a produção dessas espécies frente ao exercício. O objetivo desse estudo foi avaliar e analisar alguns marcadores do balanço redox, utilizando a saliva de indivíduos jovens e ativos antes, logo após e 24 horas após uma prova de meia maratona. A amostra foi composta por 11 indivíduos cinco homens e seis mulheres ($23,93 \pm 4,9$ anos, $1,69 \pm 0,07$ cm, $62,80 \pm 6,6$ kg). Os voluntários completaram uma prova de corrida de rua com percurso de 21,1 km. Nossos achados mostram que no grupo avaliado não houve alterações nas taxas de danos oxidativos a lipídeos antes ($0,574 \pm 0,068$ nmol TBARS/ mg proteína) logo após ($0,407 \pm 0,072$ nmol TBARS/ mg proteína) e 24 horas após a prova ($0,154 \pm 0,060$ nmol TBARS/ mg proteína), que foram quantificados através da concentração dos produtos de peroxidação lipídica (TBARS). Por outro lado a resposta antioxidante teve aumento após a prova ($305,5 \pm 118,8$ μ mol Trolox eq / L) e 24 horas depois ($369,4 \pm 219,2$ μ mol Trolox eq / L), mostrado pela capacidade antioxidante total (FRAP). A concentração de GSH não foi diferente após a prova ($4,503 \pm 0,387$ nM/ μ g proteína), mas teve uma diminuição 24 horas após a prova ($3,356 \pm 0,477$ nM/ μ g proteína). A atividade da catalase não sofreu alteração significativa em nenhum dos momentos avaliados ($5,686 \pm 4,645$ antes vs $1,863 \pm 6,581$ logo após vs $3,449 \pm 1,826$ U/mg proteína 24 horas após). Esses resultados sugerem que para esse grupo, mesmo um exercício de longa duração como uma meia maratona, não foi suficiente para promover danos oxidativos a lipídeos uma vez que, as respostas antioxidantes aumentaram após a prova.

Palavras chave: meia maratona, saliva, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Exercise is considered a promoter of reactive oxygen and nitrogen (RONS), the magnitude of this process is dependent on the type, duration and intensity of exercise. The emergence of analyzes and sample collection faster and easier, such as saliva collection, offers a promising future for the analyzes to be applied in the field to quantify the production of these species to the exercise. The aim of this study was to evaluate and analyze some markers of the redox balance, using the saliva of young and active before, immediately after and 24 hours after competing in a half marathon. The sample consisted of 11 individuals five men and six women (23.93 ± 4.9 years, 1.69 ± 0.07 cm, 62.80 ± 6.6 kg). The volunteers completed a proof of street racing with a route of 21.1 km. Our findings show that in the studied group there were no changes in the rates of oxidative damage to lipids before (0.574 ± 0.068 nmol TBARS / mg protein) after (0.407 ± 0.072 nmol TBARS / mg protein) and 24 hours after the test (TBARS 0.154 ± 0.060 nmol / mg protein) that were measured by the concentration of lipid peroxidation products (TBARS). On the other hand antioxidant response was increased after the test (305.5 ± 118.8 μ mol Trolox eq / L) and 24 hours (369.4 ± 219.2 μ mol Trolox eq / L), shown by total antioxidant capacity (FRAP). The concentration of GSH was not different after the race (4.503 ± 0.387 nM / mg protein), but had decreased 24 hours after the test (3.356 ± 0.477 nM / mg protein). Catalase activity did not change significantly in any of the time points evaluated ($5,686 \pm 4,645$ vs. $1,863 \pm 6,581$ before after vs. $3,449 \pm 1,826$ U / mg protein after 24 hours). These results suggest that for this group, even a long duration exercise as a half marathon, was not sufficient to cause oxidative damage to lipids since the answers antioxidants increased after the race.

Keywords: half marathon, saliva, oxidative stress.

1 - Introdução

A meia maratona é uma corrida com uma distância igual à metade de uma maratona, ou seja, de 21,1 km (21.097,5 metros). Fisiologicamente essa prova é considerada de resistência, predominantemente aeróbica, dinâmica, intensa, prolongada e exaustiva (COYLE, 1992). O tempo médio da prova de atletas profissionais é de aproximadamente 1 hora no masculino e um pouco mais de 1 hora no feminino.

Durante os últimos anos muitos estudiosos vêm procurando maneiras de mensurar as cargas de treino e o desempenho de atletas de diversas modalidades em diferentes fases de seu calendário esportivo, procurando verificar pré-competição e pós-competição o nível de condicionamento físico em que o atleta está, para que este consiga sua melhor condição física durante a competição (Borin *et al.*, 2007).

Entretanto, os métodos de mensuração de rendimento e fadiga dos atletas ainda são invasivos, pois a grande maioria dos métodos utiliza-se da coleta de sangue do atleta que posteriormente é levado a um laboratório dispendendo horas e até dias para que tudo seja analisado e obtenha-se um resultado fidedigno. O que se têm buscado atualmente são métodos de coleta e análises mais rápidos, precisos e menos invasivos.

Recentemente pesquisas apontam para o desenvolvimento de técnicas menos invasivas para a análise de biomarcadores de condicionamento físico, fadiga, produção de substratos, produção de radicais livres em atletas, seja pré-treino, durante ou após o treino e em competições. Neste contexto a saliva aparece com um futuro promissor (Diaz *et al.*, 2012; Reid, 2012; Demenice *et al.*, 2010; Gonzáles *et al.*, 2008)

Recentemente a análise da saliva representa uma ferramenta atrativa para o monitoramento e para o diagnóstico precoce de doenças orais e também na área do exercício (Antunes-Neto *et al.*, 2012, Diaz *et al.*, 2012; Demenice *et al.*, 2010, Gonzáles *et al.*, 2008) .Para Kammdyová e Celec (2011), as principais vantagens da saliva, em relação ao sangue referem-se à coleta simples, segura e não invasiva, além da possibilidade de um monitoramento longitudinal com

número maior de amostras e maior diversidade populacional, incluindo crianças e pessoas idosas, por exemplo.

Considerando que as corridas de rua vêm se tornando, a cada ano, mais populares e contam com um grande número de atletas amadores o presente estudo objetivou examinar alguns marcadores do balanço redox, utilizando a saliva de indivíduos jovens e ativos antes e após uma prova de meia maratona realizada na cidade do Rio de Janeiro.

2. Métodos

2.1 Sujeitos

A amostra foi composta por onze voluntários (5 homens e 6 mulheres) participantes do grupo de corrida de rua da Universidade Federal de Uberlândia. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (parecer número 166.247 – anexo I) e cada participante preencheu um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I), no qual os riscos da sua participação na investigação proposta foram explicados.

2.2 Avaliação da composição corporal

Na semana que antecedeu a prova os atletas realizaram avaliação física através de uma balança de bioimpedância da marca tetrapolar Tanita BC558 e medidas antropométricas utilizando um estadiômetro Sanny (TABELA 1).

2.2 Delineamento experimental

No dia da realização da meia maratona, os atletas foram orientados a não mudarem os padrões de sua alimentação e hidratação durante a prova. Foi solicitado que fizesse o melhor tempo possível para a prova. Para a avaliação do

balanço redox dos atletas coletamos amostras de saliva em três pontos: pré, imediatamente após o término da prova e 24 horas após o término da prova.

2.3 Coleta e processamento da saliva

A saliva foi coletada, durante três minutos em cada ponto, de maneira não estimulada pelo método de cuspe (Navazesh, 1993) em tubos plásticos (falcon) de 15 mL. Após as coletas os tubos foram guardados no gelo para transporte até o laboratório. A saliva foi centrifugada a 3500 rpm, durante 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado e aliquoteado (400µL) em 3 microtubos de 1,5 mL e armazenado -80°C para as futuras análises.

Avaliamos a atividade da enzima catalase, a concentração glutatona reduzida, peroxidação lipídica e atividade antioxidante total.

2.4 Análises bioquímicas

2.4.1 Técnicas de medida de estresse oxidativo

A peroxidação lipídica foi medida através da formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Esses complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente.

Foram preparados quatro reagentes:

- a) Ácido Tiobarbitúrico (TBA): 67g em 1ml DMSO e acrescentado mais 9 ml de água.
- b) TCA 10%: Adicionamos 10 g de ácido tricloroacético em 100 ml de água destilada.

c) TMP (1,1,3,3-tetrametoxipropano): 4,167 μL em 1 mL de etanol e adicionado 49 mL de água (500 μM).

d) Tampão fosfato (KPE) – misturou-se 80 mL da solução de KH_2PO_4 (100 mM) a 420 mL da solução de K_2HPO_4 (100 mM), juntamente com 930 mg de EDTA, pH 7.4.

A saliva foi diluída na razão de um para três (v/v); para 50 μL de saliva, 150 μL de tampão fosfato 100 mM. Após a diluição, adicionou-se 100 μL de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%) a 200 μL de amostra, resfriando-as por 15 minutos a 4°C e centrifugando-as logo em seguida a 6000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação 250 μL do sobrenadante foram retirados de cada amostra e então 300 μL do ácido tiobarbitúrico (TBA) a 50 mmol foram adicionados. Após a adição de TBA as amostras foram encubadas por 120 minutos a 95°C, e depois resfriadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados à microplaca 150 μL de amostra em duplicada, as quais foram lidas espectrofotometricamente a 532nm. A concentração dos produtos de peroxidação lipídica foi calculada baseada em uma curva padrão construída a partir de malondialdeído nas concentrações de 100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 μmol .

A atividade antioxidante total foi avaliada por meio da redução do ferro no seu estado férrico (Fe^{3+}) para seu estado ferroso (Fe^{2+}) em pH baixo, formando o complexo ferro-tripiridyltriazine (TPTZ) de coloração azul intensa, lido espectrofotometricamente a 593 nm (Benzie & Stain, 1996). Os reagentes incluem tampão acetato de sódio (300 mM. L^{-1} , pH 3.6), e 16 mL de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ por litro de tampão; 10 mmol . L^{-1} de TPTZ preparado em HCL a 40 mmol . L^{-1} e cloreto férrico ($\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$) a 20 mM, preparado no tampão acetato de sódio (300 mM. L^{-1} , pH 3.6). O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se 25 mL de tampão acetato de sódio, 2.5 mL da solução de TPTZ e 2.5 mL da solução de $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 593 nm utilizando uma leitora de microplaca (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). A atividade antioxidante total foi calculada, baseada em uma curva padrão construída a partir de trolox, nas concentrações de 1000, 800, 400, 200, 100 e 50 μM .

A atividade da catalase foi medida na saliva segundo o método proposto por Aebi (1984), por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio, lida a 240 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific GENESYS 10S – Vis e UV). O reagente de trabalho, preparado imediatamente antes do experimento é composto por tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4 50 mM e Na_2HPO_4 50 mM) e peróxido de hidrogênio a 30%. A proporção é de 1000 mL de tampão para 340 μL de peróxido de hidrogênio. Antes da leitura as amostras foram diluídas em tampão fosfato (1:10 v/v). Todas as leituras foram feitas em cubeta de quartzo. O aparelho foi zerado com tampão fosfato (1000 μL) e em seguida, as amostras foram lidas em duplicata, adicionando-se à cubeta 1000 μL da solução de trabalho e 10 μL do hemolisado diluído. O consumo do peróxido de hidrogênio foi monitorado durante 30 segundos, anotando-se as absorbâncias a cada intervalo de 15 segundos. O cálculo da atividade da catalase é dado pela equação: $[(t_0 - t_{30}) \cdot 10] / \text{proteína} \times 30$, sendo t_0 o tempo de leitura inicial, t_{30} o tempo de leitura final, 10 o fator de diluição da amostra e 30 o tempo total de leitura. A quantificação de proteína total é necessária para o cálculo.

O ensaio para avaliação da GSH é baseado na reação desse tripeptídeo com o DTNB [ácido 2- nitro-benzóico (5,5' – ditiobis)], que produz como cromóforo o TNB, o qual tem absorbância máxima a 412 nm. A taxa de formação do TNB medida a 412 nm é proporcional à concentração de GSH na amostra (Rahman *et al.*, 2007).

2.4.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína totais das amostras foi realizada de acordo com o protocolo de Bradford (1976) adaptado para microplaca. Em cada *well* da microplaca foi adicionado 5 μL de saliva, 95 μL de água deionizada e 200 μL do reagente de Bradford. O ensaio foi realizado em duplicata e lido à 595nm à temperatura ambiente.

2.5 Estatística

Inicialmente, foi verificada a normalidade de distribuição dos dados através do teste de D'Agostino e Pearson. Para análise dos dados que passaram no teste de normalidade utilizamos *anova one-way* com pós teste de Tukey. Para os dados não paramétricos utilizamos o teste de Friedman e pós-teste de Dunn. Para a análise dos tempo para realização da prova utilizamos o teste *t* de *student*. O nível de significância adotado para todas as análises foi de $p < 0,05$. Os dados foram mostrados em média e desvio padrão para dados normais. Para dados não paramétricos foram utilizados a mediana e o desvio padrão.

3. Resultados

Todos os atletas completaram a prova. A temperatura no dia estava em torno de 17°C, nublado e, em alguns momentos, choveu. O tempo médio do cumprimento da prova pelos atletas foi de $156 \pm 24,9$ min, não houve diferença entre os tempos para homens e mulheres ($p= 0,125$).

A concentração dos produtos de peroxidação lipídica foi maior antes da prova quando comparada com o pós prova. Os níveis de TBARS seguiram diminuindo após a prova, sendo que, 24 horas após o término da prova as concentrações estavam menores do que os valores iniciais e após a prova ($p<0,0001$) (Figura 1).

Quanto à capacidade antioxidante total houve aumento significativo da mesma, logo e 24 horas após a prova quando comparada com os valores antes da prova ($p<0, 0001$) (Figura 2).

Na análise das concentrações da glutathione reduzida não houve diferença significativa após a prova quando comparada com os valores antes da prova. Os valores de GSH 24 horas depois da prova foram menores que os valores pré e pós prova ($p<0,0001$) (Figura 3).

Na avaliação da atividade da enzima catalase não houve diferença estatisticamente significativa entre os três tempos analisados ($p<0,4698$) (Figura 4).

4. Discussão

O resultado de dano oxidativo demonstrado através do ensaio de TBARS mostra que após a prova de meia maratona não houve danos oxidativos a lipídeos neste grupo de atletas.

Por um lado esse achado vai ao encontro com alguns trabalhos como o de Tian e colaboradores (2010) que nas primeiras horas após o término de uma corrida de 21 km não houve diferença nas concentrações de tais produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico TBARS, mas neste trabalho foi analisado plasma. Por outro lado, outros trabalhos mostram diferentes resultados nos valores de peroxidação lipídica após exercício (Demenice *et al.*, 2010).

Este resultado pode ser explicado pelo fato de que as sessões de treinamento realizado para esta foi eficiente em promover adaptações nas defesas antioxidantes. Tais adaptações são descritas na literatura como um dos efeitos do treinamento de aeróbico.

Outro fator que poderia colaborar para a diminuição do dano oxidativo seria o clima ameno encontrado no dia da prova, o que pode atenuar o estresse térmico.

Alguns trabalhos reportam que exercícios praticados em ambientes quentes (33°C) quando comparados à prática de exercícios em ambientes frios (7°C) contribuem para o aumento da temperatura corporal e também para o aumento de biomarcadores de desbalanço redox ou estresse oxidativo (Quindry *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2011).

Alguns fatores que são determinantes para a diminuição da incidência de raios ultravioletas (UV) foram observados durante a prova, como, o tempo nublado, a hora da realização da prova (antes das 10 horas da manhã) e a estação (inverno) (Utrillas *et al.*, 2013). A menor incidência de raios UV sob estas condições também poderiam ter amenizado a produção de espécies reativas de oxigênio (Yin *et al.*, 2013).

A atividade antioxidante na saliva total aumentou após a prova, fato que também pode explicar a redução dos produtos de peroxidação lipídica e também demonstra uma resposta induzida pelo treinamento aeróbico o que pode refletir melhoradas defesas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo o exercício. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que analisaram saliva (González *et al.*, 2008) e plasma, esses trabalhos relataram

aumento de nutrientes antioxidantes e potencial antioxidante em resposta ao exercício (Child *et al.*, 1998; Liu, 1999; Mastaloudis *et al.*, 2004; McAnulty *et al.*, 2003; Nieman *et al.*, 2003).

A concentração do marcador antioxidante GSH na saliva não apresentou diferença significativa no pós-exercício. Outros estudos que também utilizaram saliva como biomarcador do estado redox não mostraram diferença e até diminuição das concentrações de GSH após o exercício. O trabalho de Demenice *et al* (2010) não mostrou diferença nas concentrações salivares de GSH, utilizando o exercício resistido em uma sessão aguda de 3 séries de 10 repetições a 75% de 1RM. Benitez-Sillero *et al* (2009) mostraram redução nas concentrações salivares de GSH em crianças não atletas após teste incremental de corrida. O trabalho de Nikolaidis *et al* (2007) analisou o estado redox do sangue em crianças com experiência em treinamento de natação, eles mostraram diminuição nas concentrações de GSH sanguíneo após 12 sessões de 50 metros com velocidade entre 70% - 75% da velocidade máxima dos voluntários para 50 metros.

A concentração de GSH 24 horas após a prova diminuiu significativamente quando comparado aos outros tempos medidos (pré e pós). A diminuição de GSH pode estar relacionada ao papel deste composto na regulação das vias de transcrição do fator de transcrição nuclear KB (NF-kB), proteínas quinases ativadas dos mitógenos (MAPK), e proteína quinase B (Akt)/ alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) que estão envolvidas no processo de inflamação e recuperação muscular após microlesões induzidas pelo exercício (Michailidis *et al.*, 2013).

A atividade da enzima antioxidante catalase também não teve diferença significativa após o exercício, embora na literatura temos resultados controversos com relação a atividade dessa enzima (Powers e Jackson, 2008)

5. Conclusão

Nossos dados sugerem que, após uma prova de meia maratona, em um grupo de atletas universitários os níveis de atividade antioxidante total aumentam

na saliva em resposta ao exercício, atenuando dessa maneira as respostas oxidativas com a diminuição da peroxidação lipídica.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Ademais, agradecemos à professora doutora Verônica Salerno Pinto e seus alunos mestre Diego Viana Gomes e graduando Frederico Lima pelos valiosos ensinamentos, incentivo e confiança. Declaramos não haver conflito de interesse.

6. Referências

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods enzymol.* 1984; 105: 121-126.

Antunes-Neto, J. M. F. ; Nader, B. B. ; Donadon, C. C. ; Macedo, D. V. Biomarcadores de estresse no futebol: dosagem sanguínea dos níveis de creatina quinase. *Revista Brasileira de Futsal e Futebol.* 2012; 4 :87-97.

Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(3):189-94.

Benitez-Sillero JD ,Perez-Navero JL , Tasset I , Guillen-Del Castillo M , Gil-Campos M, Tunez I. Influence of intense exercise on saliva glutathione in prepubescent and pubescent boys. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 106:181–186.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239:70–76.

Borin JP, Gomes AN, Leite GS. Preparação desportiva: aspectos do controle da carga de treinamento nos jogos coletivos. *Revista da Educação Física/UEM Maringá,* 2007; 18: 97-105.

Bradford, M.M. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254.

Campos M ,Tunez I . Influence of intense exercise on saliva glutathionein prepubescent and pubescent boys .Eur J Appl Physiol. 2009; 106 :181 – 186.

Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to asimulated half-marathon run. Med Sci Sports Exer.1998; 30: 1603–1607.

Coyle EF. Physiological determinants of endurance exercise performance. J Sci Med Sport. 1992; 2:181-9.

Deminice R, Sicchieri T, Payão PO, Jordão AA. Blood and Salivary Oxidative Stress Biomarkers Following an Acute Session of Resistance Exercise in Humans. Int J Sports Med. 2010; 31: 599 – 603.

Diaz MM, Bocanegra OL, Teixeira RR, Santos S, Espindola FS. Salivary Nitric Oxide and Alpha-amylase as indexes of Training Intensity and load. International Journal of Sports Medicine. 2012; 09, p 683.

Gomes, E.C., Stone, V., & Florida-James, G. Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretionafter 8 km run. European Journal of Applied Physiology. 2011; 111(9), 2089–2097.

González, D.; Marquina, R.; Rondón, N. Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. Research in Sports Medicine. 2008; 16: 128-137.

Kamodyová N, Celec P. Salivary markers of oxidative stress and Salivette collection systems. Clin Chem Lab Med. 2011; 49(11):1887-90.

Liu M, Bergholm R, Makimmattila S, Lahdenpera S, Valkonen M, Hilden H, Yki-Jarvinen H, Taskinen M. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. Am J Physiol. 1999; 273:E1083–E1091.

Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation,in ultramarathon runners. Free Radic Biol Med. 2004; 36: 1239–1341.

McAnulty SR, McAnulty, LS, Nieman DC, Morrow JD, Utter AC, Henson DA,Dumke CL, Vinci DM. Influence of carbohydrate ingestion on oxidative stressand plasma antioxidant potential following a 3 h run. Free Rad Res. 2003; 37: 835–840.

Michailidis Y, Karagounis LG, Terzis G, Jamurtas AZ, Spengos K, Tsoukas D, Chatzinikolaou A,Mandalidis D, Stefanetti RJ,Papassotiriou I,Athanasopoulos S, Hawley JA, Russell AP, Fatouros IG. Thiol-based antioxidant supplementation

alters human skeletal muscle signaling and attenuates its inflammatory response and recovery after intense eccentric exercise. *Am J Clin Nutr.* 2013; 98:233–45.

Miricescu, D.; Greabu, M.; Totan, A., Didilescu, A. Radulesco, R. The antioxidant potential of saliva: clinical significance in oral diseases. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology.* 2011; (2): 139-43.

Navazesh M. Methods for Collecting Saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993; 694: 72–77.

Nieman DC, Dumke CL, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty LS, Lind RH, Morrow JD. Immune and oxidative changes during and following the Westerns states endurance run. *Int J Sports Med.* 2003; 24: 541–547.

Nikolaidis MG ,Jamurtas AZ , Paschalis V , Fatouros IG , Koutedakis Y , Kouretas D . The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008 ; 38 : 579 – 606

Nikolaidis MG, Kyparos A, Hadziioannou M. Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007; 32:197–205.

Ohkawa, H., Ohishi , N., Yagi , K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351.

Powers, S.K.; Jackson, M.J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Ver.* 2008; 88: 1243-1276.

Quindry J, Miller L, McGinnis G, Kliszczewicz B, Slivka D, Dumke C, Cuddy J, Ruby B. Environmental Temperature and Exercise-Induced Blood Oxidative Stress. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism.* 2013; 23: 128 -136.

Reid MB. Free radicals and muscle fatigue: of ROS, canaries, the IOC. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 169–179.

Schipper, RG.; Silletti, E.; Vingerhoeds, MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(12):1114-35.

Tian Y, Nie J, Tong TK, Baker JS, Thomas NE, Shi Q. Serum oxidant and antioxidant status during early and late recovery periods following an all-out 21-km run in trained adolescent runners. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 110:971–976.

Utrillas MP, Marín MJ, Esteve AR, Estellés V, Gandía S, Núñez JA, Martínez-Lozano JA. Ten years of measured UV Index from the Spanish UVB Radiometric Network. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013; 125: 1–7.

Yin Y, Li W, Son YO, Sun L, Lu J, Kim D, Wang X, Yao H, Wang L, Pratheeshkumar P, Hitron AJ, Luo J, Gao N, Shi X, Zhang Z. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. *Toxicology Applied Pharmacology*. 2013; 269: 89–99

Legendas

Tabela 1. Idade, massa, altura, índice de massa corporal (IMC) e percentual de gordura 4 dias antes da prova. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (n=11).

Figura 1. Concentrações salivares de produtos de peroxidação lipídica em atletas amadores antes, após e 24 horas depois de uma meia maratona. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. * Diferenças significativas (Teste de Anova *oneway*, $P < 0.05$); n=11

Figura 2. Avaliação da atividade antioxidante total da saliva em atletas amadores antes, após e 24 horas depois de uma meia maratona. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. * Diferenças significativas (Teste de Anova *oneway*, $P < 0.05$); n=11

Figura 3. Concentrações salivares de glutathiona reduzida em atletas amadores antes, após e 24 horas depois de uma meia maratona. Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil. * Diferenças significativas (Teste de Friedman, $P < 0.05$), n=11

Figura 4. Avaliação da atividade da enzima catalase em atletas amadores antes, após e 24 horas depois uma meia maratona. Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil. * Diferenças significativas (Teste de Friedman, $P < 0.05$), n=11

Tabela 1

IDADE	23,93 ± 4,9
MASSA (kg)	62,80 ± 6,6
ALTURA (cm)	1,69 ± 0,07
IMC	21,84 ± 1,4
% GORDURA	15,98 ± 5,8

Figura 1

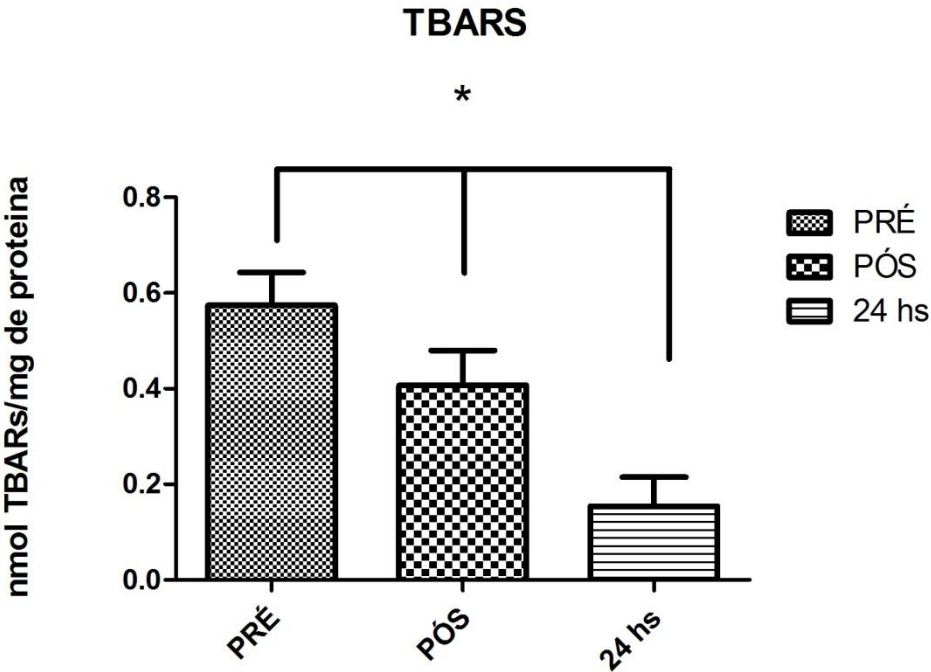


Figura 2

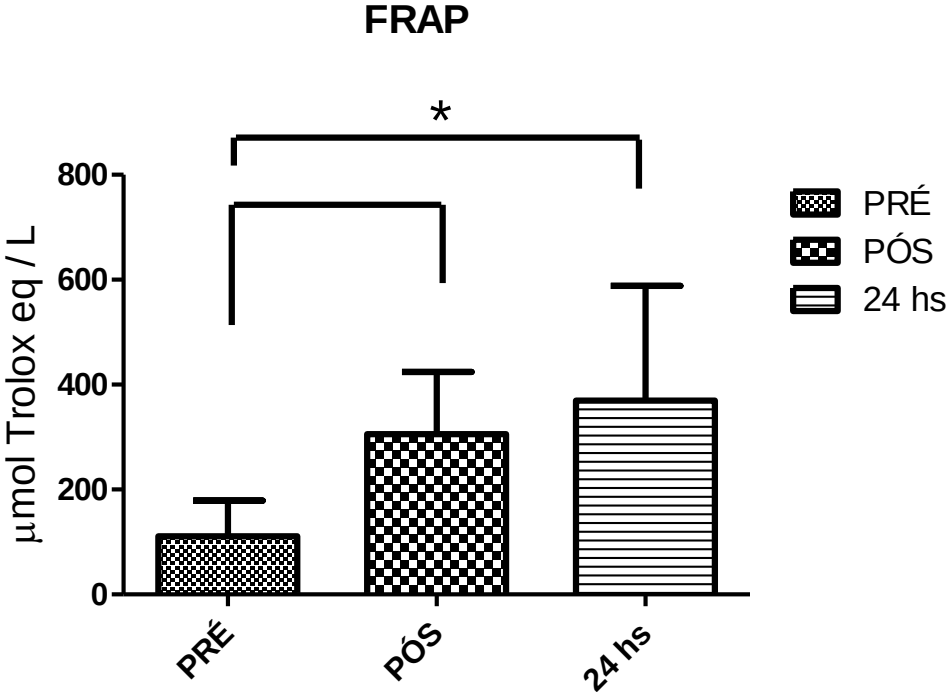


Figura 3

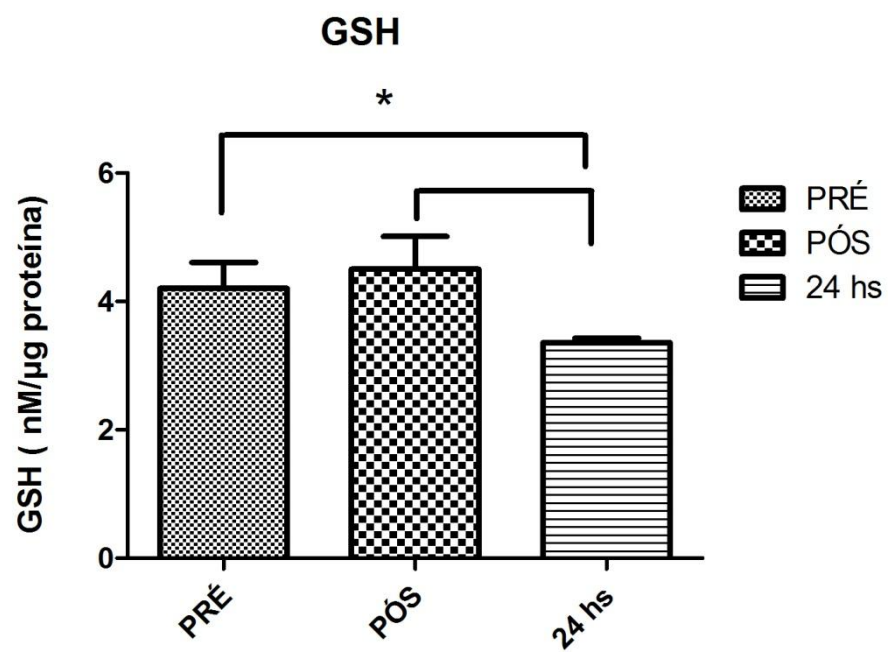
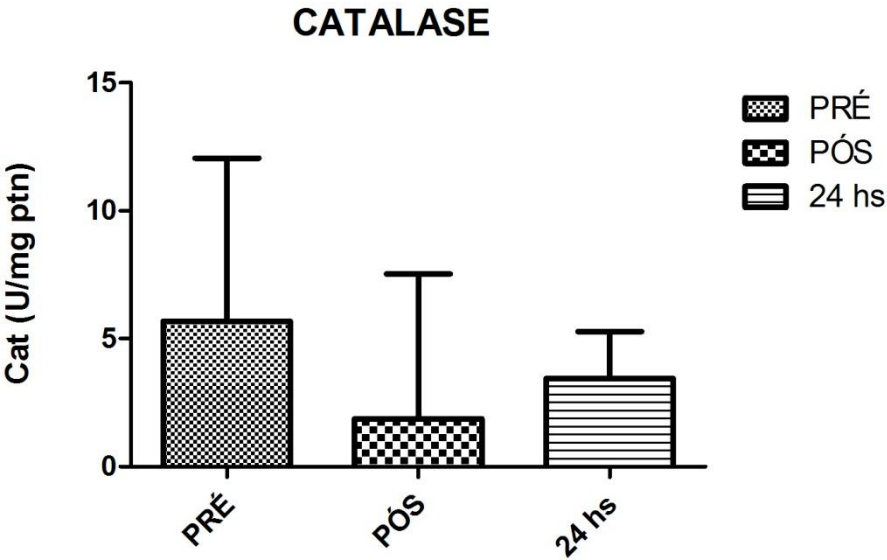


Figura 4



ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do comitê de ética e pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de biomarcadores salivares de estresse oxidativo após meia maratona, em corredores amadores

Pesquisador: Françoise Vasconcelos Botelho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 10549812.8.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Genética e Bioquímica

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 166.247

Data da Relatoria: 07/12/2012

Apresentação do Projeto:

Durante os últimos anos muitos estudiosos vem procurando uma maneira de mensurar o desempenho de atletas de diversas modalidades em diferentes fases de seu calendário esportivo, procurando verificar pré-competição e pós competição o nível de condicionamento físico em que o atleta está, para que este consiga ir à sua competição na sua melhor condição física. Entretanto, os métodos de mensuração de rendimento e fadiga dos atletas ainda são bem invasivos, pois a grande maioria dos métodos utiliza-se da coleta de sangue do atleta e posteriormente isto é levado a um laboratório levando horas e até dias para que tudo seja analisado e obtenha-se um resultado fidedigno. Alguns trabalhos mostram que o exercício de endurance ou ultraendurance é capaz de aumentar o estresse oxidativo (Mastaulodis, 2001; Nieman 2002). Nieman (2003) mostrou aumento nas concentrações de FRAP, hidroperóxidos lipídicos e F2- isoprostanos após uma prova de ultraendurance.

Nesta pesquisa busca-se entender dinâmica de marcadores salivares que possam prever o estado redox ou o estresse oxidativo após uma prova de endurance em atletas amadores.

Para isso, será analisado amostras de saliva de 11 voluntários atletas da equipe de corrida de rua da Universidade Federal de Uberlândia. Os atletas participarão de uma prova de corrida de rua entre as distancias de 15 km e 21 km, as coletas de saliva serão realizadas antes da prova e em mais dez momentos depois da prova: imediatamente após o termino da prova, 30 minutos, 1 hora,

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



2 horas, 4 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após. A prova será realizada entre os meses de Janeiro e Fevereiro.

Para a determinação dos marcadores de estresse oxidativo avaliarão a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. A concentração de antioxidantes não enzimáticos glutatona oxidada, glutatona reduzida e ácido úrico. Marcadores de dano oxidativo lipídico pela concentração de hidroperóxidos lipídicos e atividade antioxidante total.

Critério de Inclusão:

Homens e mulheres ativos e saudáveis, atletas praticantes de atletismo; Idade entre 18 e 45 anos;

Critério de Exclusão:

Diabetes hemorrágica, disfunção plaquetária, trombocitopenia com contagem de plaquetas inferior a 150.000/mm³. Terapia anticoagulante com INR, PT ou PTT anormal. Uso de marca-passo ou desfibrilador implantado. Inabilidade para ler e entender os documentos necessários. Hipertensão não controlada. Disritmia diagnosticada que pode representar risco durante exercício. Arritmia ventricular complexa; Histórico de síncope relacionada a exercícios. Histórico de infarto do miocárdio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar as mudanças nos marcadores de estresse oxidativo na saliva em corredores amadores após uma prova de endurance.

Objetivo Secundário:

Avaliar o estado de treinamento dos atletas e fornecer dados aos treinadores que auxiliem a programação dos treinamentos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Com relação a prova de corrida de rua, não há relatos na literatura sobre eventuais problemas físicos ou psíquicos, durante ou após os testes. Embora a probabilidade destas lesões ocorrerem é mínima, caso ocorram, os atletas terão toda assistência médica assegurada pela organização da competição, como é de costume nessas provas, uma vez que, a organização cobra uma taxa de inscrição e em contra partida oferece esta segurança aos atletas.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Benefícios:

Os voluntários terão o benefício de terem, junto aos treinadores, dados que poderão orientar os próximos ciclos de treinamento para melhorar o desempenho e a recuperação após as atividades que requeiram grandes esforços físicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta méritos para ser executada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos são apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final: maio de 2013.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

z O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

ANEXO 2 –Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“Avaliação de biomarcadores salivares de estresse oxidativo após meia maratona, em corredores amadores”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores Prof. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, Erickson Messias Bezerra dos Santos, Maria Carolina Siqueira, Miguel Mauricio Díaz Gómez, Renata Roland Teixeira, Olga Lucia Bocanegra Jaramillo.

Nesta pesquisa estamos buscando entender dinâmica de marcadores salivares que possam prever o estado redox ou o estresse oxidativo após uma prova de endurance em atletas amadores.

Você irá participar de uma prova de corrida de rua que terá uma distância mínima de 15 quilômetros e uma máxima de 21 quilômetros. A prova consiste em percorrer estas distâncias um ponto ao outro caminhando ou correndo no menor tempo possível.

O procedimento da coleta de saliva será realizado pelos pesquisadores responsáveis. O método de coleta é simples rápido, ele será feito sem estimulação, como por exemplo, mastigar gomas ou chicletes, a saliva será analisada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia.

Com relação à prova de corrida de rua, não há relatos na literatura sobre eventuais problemas físicos ou psíquicos, durante ou após os testes. Embora a probabilidade destas lesões ocorrerem é mínima, caso ocorram, você terá toda assistência médica assegurada pela organização da competição, como é de costume nessas provas, uma vez que, a organização cobra uma taxa de inscrição e em contra partida oferece esta segurança aos atletas.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá perda ou ganho financeiro por participar desta pesquisa. O benefício previsto é a possibilidade de uma avaliação física e cardiológica, fornecida em uma devolutiva ao final do estudo.

Você é livre para desistir de participar da pesquisa a qualquer momento sem lhe causar prejuízo. Uma cópia deste termo de consentimento Livre e Esclarecimento ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa você poderá entrar em contato com os pesquisadores no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, localizado na Av Pará, nº 1720 Bloco E sala 39a, Campus Umuarama, Uberlândia – MG, CEP: 38400-902, telefone: (34) 3218-2477, e com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, localizado na Av. João Naves de Ávila, nº 2121 Bloco 1ª sala 224, Campus Santa Mônica, Uberlândia – MG, CEP: 38408-100, telefone: (34) 3239-4131.

De acordo,

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa - RG: _____