

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

**BIOMARCADORES SALIVARES, PLASMÁTICOS E
NEUROMUSCULARES COMO DETERMINANTES DO
LIMIAR ANAERÓBIO.**

Aluna: Vanessa Neves de Oliveira
Orientador: Foued Salmen Espíndola
Co-Orientador: Gilmar da Cunha Sousa

UBERLÂNDIA – MG
2005

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

**BIOMARCADORES SALIVARES, METABÓLICOS E
NEUROMUSCULARES COMO DETERMINANTES DO
LIMIAR ANAERÓBIO.**

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

Aluna: Vanessa Neves de Oliveira

Orientador: Foued Salmen Espíndola

Co-Orientador: Gilmar da Cunha Sousa

UBERLÂNDIA – MG

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

- O48b Oliveira, Vanessa Neves de, 1979-
Biomarcadores salivares, metabólicos e neuromusculares
como deter-
minantes do limiar anaeróbio / Vanessa Neves de Oliveira. -
Uberlândia, 2005.
101f. : il.
Orientador: Foued Salmen Espíndola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Progra-ma de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Teses. I.
Espíndola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. III. Título.

CDU:

612.766.1(043.3)

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

TÍTULO

ALUNO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____ (Orientador)

Examinadores:

Data da Defesa: ____/____/____

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

(Orientador)

Uberlândia, ____/____/____

ÍNDICE

1. Resumo Geral.....	7
2. Introdução Geral.....	9
2.1 Saliva.....	10

2.2 Proteínas salivares	11
2.2.1 Proteínas ricas em prolina.....	11
2.2.2 Alfa amilase	12
2.2.3 Peroxidase.....	12
2.2.4 Mucinas.....	13
2.2.5 Cistatina.....	13
2.2.6 Estaterina.....	13
2.3-Eletroforese.....	13
2.3.1 SDS-PAGE.....	14
2.3.2 Perfil eletroforético das proteínas salivares.....	15
2.4 Mecanismo de Secreção Salivar	17
2.4.1 Mecanismos controladores da secreção salivar.....	18
2.4.1.1 Controle Neural.....	18
2.4.1.2 Duração e Intensidade do Estímulo.....	19
2.5 Efeito do Exercício na Secreção e Composição Salivar	19
2.5.1 Taxa de fluxo	19
2.5.2 Composição protéica.....	20
2.5.3 Lactato	21
2.5.4 Imunoglobulinas.....	21
2.5.5 Cortisol.....	22
2.5.6 Eletrólitos.....	23
3 Eletromiografia.....	24
4 Produção/remoção do lactato e fadiga	24
5 Limiar Anaeróbio.....	28
5.1 Métodos de análise do limiar anaeróbio	29
5.1.1 Análise do lactato sanguíneo.....	29
5.1.2-Análise das catecolaminas plasmáticas.....	30
5.1.3 Análise da ventilação pulmonar	32
5.1.4 Análise da saliva	33
5.1.5 Análise do sinal eletromiográfico	35
5.2 Referências Bibliográficas	37
6. Capítulo Único	57
6.1 Título: Blood lactate, saliva total protein and alpha-amylase, electromyography as parameters to evaluate anaerobic threshold during physical stress.	58
6.2 Abstract.....	60
6.3 Resumo.....	61
6.4 Introdução	62
6.5 Métodos.....	64
6.5.1 Voluntários.....	64
6.5.2 Teste de esforço com incremento de carga em cicloergômetro.	64

6.5.3 Coleta da saliva e mensuração da proteína total e atividade da α -amilase.....	65
6.5.4 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	65
6.5.5 Coleta e Análise do Sinal Eletromiográfico	66
6.5.6 Coleta e análise do sangue	67
6.5.7 Determinação do limiar anaeróbio	68
6.5.8 Análise estatística.....	68
6.6 Resultados	69
6.7 Discussão	72
6.8 Referencia Bibliográfica	76
7 Tabela 1.....	81
8 Legendas:	82
9 Ilustrações.....	84
9.1 Figura 1.....	84
9.2 Figura 2.....	85
9.3 Figura 3.....	86
9.4 Figura 4.....	87
9.5 Figura 5.....	88
10 Conclusão Geral.....	89
11 Anexos.....	91
11.1 ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	92
11.2 ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	93
11.3 ANEXO III- CARTA DE ESCLARECIMENTO	95
11.4 ANEXO IV – NORMAS DA PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA PARA CONFEÇÃO DA VERSÃO FINAL DO MESTRADO (www.cogeb.ufu.br).....	96
11.5 ANEXO V- NORMAS DA EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY	99

1. Resumo Geral

O exercício induz o aumento no recrutamento de unidades motoras e alterações bioquímicas nos sistemas corporais que modificam a composição de alguns componentes do sangue e saliva, entre outros fluidos corporais. Essas alterações podem ser usadas como indicadores da resposta fisiológica dos vários sistemas. A análise de componentes salivares, tais como, eletrólitos, proteína total e atividade da α -amilase para detectar o limiar salivar (LAN_{sa}), e atividade elétrica do músculo para detectar o limiar eletromiográfico (EMG_{lan}) podem representar uma alternativa não invasiva na determinação da intensidade de exercício correspondente ao limiar anaeróbio (LAN). A influência do exercício sobre o lactato sanguíneo, alguns biomarcadores salivares (proteína total e da alfa amilase) e neuromusculares foram investigados, observando-se a relação destas variáveis com o LAN. Treze ciclistas ($22,6 \pm 3,5$ anos; $1,78 \pm 0,2$ cm de altura; $71,8 \pm 5,76$ Kg) foram submetidos ao teste de esforço progressivo em cicloergômetro sendo dois minutos cada estágio. Ao final de cada estágio e no quinto e décimo quinto minutos após o teste eram coletadas amostras de sangue e saliva e captado os sinais elétricos dos músculos vasto lateral e vasto medial de ambas as pernas. Mensurou-se o lactato sanguíneo e nas amostras de saliva determinou-se a concentração da proteína total, a atividade da alfa e o perfil eletroforético de proteína. O LAN foi determinado pelo modelo de regressão linear bissegmentado. Os limiares anaeróbios de lactato (LAL) foram altamente correlacionáveis com os limiares de proteína total (PAT) ($r=0,90$ e $p>0,05$) e com os limiares eletromiográficos do músculo vasto lateral direito (EMG_{lanVLD}) ($r=0,83$ e $p>0,05$). A análise da concentração de lactato, proteína total e atividade da alfa amilase apresentaram diferenças significativas do repouso ao ultimo estágio de exercício ($p<0,05$) e deste aos quinze minutos após o termino do exercício ($p<0,05$). A concentração da proteína total salivar e a atividade elétrica do músculo vasto lateral direito são bons preditores do LAN. Além disso, tanto a atividade quanto a concentração da alfa amilase e da proteína total salivar são influenciados pelo estado de estresse antes, durante e após o exercício.

Palavras chave: saliva, eletromiografia, limiar anaeróbio, SDS-PAGE, amilase.

2. Introdução Geral

O limiar anaeróbio (LAN) é um parâmetro de aptidão aeróbia extensivamente utilizada em clínica médica (HOLLMANN, 1985), na prescrição de intensidades de exercício para o treinamento (OLIVIERA, 1994) e em pesquisas na área de fisiologia do exercício (SCHAUETZ et al., 1995); além de ser um importante determinante da tolerância ao exercício prolongado devido aos prejuízos musculares e efeito sistêmico provenientes da concentração elevada de lactato.

Ultimamente vários protocolos têm sido utilizados para determinação do LAN. Alguns utilizam-se de variáveis ventilatórias (RIBEIRO et al., 1986), metabólicas (dosagens de lactato sanguíneo) (HECK et al., 1985); salivares (amilase, eletrólitos, lactato salivar) (CHICHARRO et al., 1994); eletromiográficas (HUG et al., 2003; LUCIA et al., 1997), dentre outros. Portanto, buscou-se neste trabalho investigar as respostas bioquímicas e fisiológicas de alguns sistemas, além de correlacioná-los com o ponto de limiar anaeróbio decorrente da avaliação do lactato sanguíneo.

Sendo assim, as informações geradas neste estudo abrirão perspectivas para trabalhos comparativos de bioquímica e fisiologia do exercício. Além disso, os dados apresentados contribuirão para o enriquecimento metodológico na determinação da transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio.

2.1 Saliva

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

Várias funções são atribuídas às secreções salivares, entre elas: a) Umedecer as membranas mucosas da área de aerodigestiva superior, b) facilitar a fala e controlar a flora bacteriana da boca, c) Prover enzimas destinadas no preparo da comida para digestão; d) Produzir hormônios e outras combinações farmacologicamente ativas; e) Molhar a pele de animais como resposta a tensão

de calor, obtendo a mesma possibilidade refrescante pela transpiração; f) Defesa e matança (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989).

A saliva é normalmente incolor, um fluido diluído com densidade que percorre de 1002 para 1012. Seu pH usualmente se aproxima de 6.64, mais varia dependendo do nível de CO_2 no sangue. Quando o nível de CO_2 no sangue está elevado, uma alta proporção de CO_2 é transferida do sangue para a saliva e o pH salivar diminui (CHICHARRO et al., 1998).

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

2.2 Proteínas salivares

2.2.1 Proteínas ricas em prolina

Essas proteínas têm se mostrado aderir fortemente e inibir a formação da hidroxiapatita (HAY, 1975; OPPENHEIM et al., 1986). Elas aumentam a atividade

glicolítica dos micro-organismos salivares (HOLBROOK e MOLAN, 1975) e apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (MACKAY et al., 1984).

2.2.2 Alfa amilase

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

A amilase não é sintetizada somente por glândulas salivares, mas também pelas células do pâncreas. As duas amilases têm composições químicas muito similares e são imunologicamente indistinguíveis (STIEFEL e KELLER, 1973 APUD MINAGUCHI e BENNICK, 1989), mas tem diferentes pontos isoelétricos, pesos moleculares e propriedades catalíticas (STIEFEL e KELLER, 1973, 1975 APUD MINAGUCHI e BENNICK, 1989). Lenander-Lumikari et al., (2000) mencionam que a amilase é sintetizada primariamente em célula acinar e menos consistentemente na célula proximal dos ductos intercalados.

2.2.3 Peroxidase

Peroxidase salivar catalisa a oxidação de tiocianeto (SCN^-) pela degradação de H_2O_2 para gerar um íon hipotiocianeto (OSCN) e íons hipotiocianos (HOSCN), os quais funcionam como agentes microbianos (IWAMOTO e MATSUMURA, 1966; IWAMOTO et al., 1967; SLOWEY et al., 1968; HAMON e KLEBANOFF, 1973). Existem na saliva total humana, dois grupos diferentes de peroxidases, um ácido e outro básico (TENOVUO, 1981). A enzima cujo ponto isoelétrico é alcalino é derivada das glândulas salivares e são encontradas em formas múltiplas e com diferentes pontos isoelétricos e pesos moleculares (IWAMOT et al., 1967).

2.2.4 Mucinas

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

2.2.5 Cistatina

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

2.2.6 Estaterina

Estaterina é uma fosfoproteína com 43 resíduos a qual inibe a precipitação espontânea e o crescimento secundário de sais de cálcio e fosfato. A proteína pode assim, prevenir a precipitação da saliva, a qual é normalmente supersaturada com cálcio e fosfato, ajudando a manter a estabilidade dos dentes no meio (HAY, 1973; HAY e GRØN, 1976).

2.3-Eletroforese

O fato de uma molécula com carga elétrica líquida mover-se em um campo elétrico, é denominada eletroforese; esta oferece um meio poderoso de separação de proteínas e outras macromoléculas, como DNA e RNA (BERG et al., 2002).

As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, em vez de em solução livre, por dois motivos: a) o gel suprime correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura, requisito para uma separação eficaz; b) o gel age como uma peneira molecular que melhora a separação. As moléculas que são menores em relação aos poros no gel movem-se facilmente através dele, ao passo que as moléculas muito maiores eu os poros são quase imóveis. Os géis de poliacrilamida são quimicamente inertes, sendo

formados prontamente de concentrações variáveis de acrilamida e de metileno-bisacrilamida (um reagente que promove interligações) no momento da polimerização (BERG et al., 2002).

Os métodos eletroforéticos mais usados são: focalização isoeletrica (IEF), eletroforese nativa (PAGE), e a eletroforese desnaturante (SDS-PAGE). Na tabela abaixo estão resumidos os três tipos.

Tabela I – Métodos eletroforéticos mais usados.

SIGLA	IEF	PAGE	SDS-PAGE
Princípio de separação	Ponto isoeletrico	Carga, forma	Massa molecular
Estado das proteínas	Nativo	Nativo	Desnaturado
Exemplo de área de aplicação	Resolução de questões dependentes da obtenção de perfis complexos de proteínas. Ex: diferenciação de espécies biológicas	Diferenciação de produtos de genes alélicos. Ex: em estudos de genética de populações	Avaliação de massas moleculares de proteínas específicas ou avaliação de graus de pureza de extratos proteicos

2.3.1 SDS-PAGE

As proteínas podem ser bem separadas, em função de sua massa, pela eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. A mistura de proteínas é primeiro dissolvido em uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico que rompe quase todas as interações não-covalentes nas proteínas nativas. Adiciona-se também mercaptoetanol ou ditioneitol para reduzir as pontes dissulfeto. Os anions do SDS ligam se às cadeias principais em uma proporção em torno de um SDS para cada dois aminoácidos, o que dá ao complexo de SDS com uma proteína desnaturada uma carga negativa aproximadamente proporcional à massa da proteína. As proteínas no gel podem

ser visualizadas corando-as com prata ou com um corante como o azul Coomassie (BERG et al., 2002).

A distancia de migração de proteínas em SDS PAGE variam na razão inversa do logaritmo da sua massa molecular. Logo, para determinar a massa molecular de uma banda protéica, basta incluir, na mesma eletroforese, proteínas de massas moleculares conhecidas. Terminada a eletroforese, mede-se a distancia de migrações de todas as bandas, e constrói-se uma reta de calibração tendo em contra as migrações e os logaritmos das massas moleculares das proteínas conhecidas (**distancia de migração = f(log Massa molecular)**).

2.3.2 Perfil eletroforético das proteínas salivares

Técnicas contemporâneas de eletroforese têm facilitado os extensivos estudos das famílias das proteínas salivares e rendido fascinantes informações sobre elas (BEELEY, 1993). SDS-PAGE usado para estudar as proteínas salivares da parótida identificou todos os seus principais componentes e substanciais variações entre indivíduos mostrados pelo aumento no polimorfismo do peso molecular das proteínas ricas em prolina e histatinas (BEELEY, 1991). A tabela abaixo mostra as proteínas salivares presentes na secreção do ducto, dentre elas, estão também aquelas que pertencem as famílias de proteínas polimórficas.

Tabela II- Proteínas salivares humanas (*proteínas polimórficas)

Proteínas	Mr	pI	Funções
*Proteínas ricas em prolina			liga-se a hidroxiapatita
ácida	16300,9	3.5-4.5	ligante de Ca ²⁺
básica	6000-12000	>8.0	Adesão de microorganismos
glicosilada	389000	>8.0	Protenção contra taninos dentários
*alfa-amilase			Digestão
glicosilada	63000		?antibacteriana
não glicosilada	59000		
*histatinas	45000-7000	7.0,	anti fungica(não imune)
		>9.5	formação de pelicular
			regulação da mineralização
Estaterina	5380	4.2	Inibe a precipitação de CaPO ₄
			regular a mineralização
			Ligar-se a hidroxiapatita
*Cistatinas			inibir a cistatin protease
			inibir a precipitação de CaPO ₄
			Ligar-se a hidroxiapatita
* Fosfatase ácida			?
Mucinas			lubrificação
MG1	>1000000		alutinação bacteriana
MG2	200000-250000		formação de película
sulfatada	15000-300000		
Kalicleína	9600	3.8-4.5	protease
			? Ativação de hormônios polipeptídeos
Imunoglobulinas (slg A, etc.)	405000		Antibacterianas
Lactoferrina	77000		Antibacterianas
lisozima	15000		Antibacterianas
lactoperoxidase			Antibacterianas
gustina	37000		sensação de gosto
Albumina			?
Componente secretório	67000		
anidrase carbônica	71000		manutenção do tampão de bicarbonato
Poli-peptídeo			manutenção da mucosa oral e gastrointestinal
hormônios, e.g.			
fator de crescimento epidermal			

Fonte: Beeley 1993

As α -amilases salivar são produtos do gene da amilase salivar (*Amy 1*) e são distintas do gene pancreático (*Amy2*). As isoenzimas da α -amilase salivar que surgem de modificações pós-transcricionais dos produtos desses genes tem sido caracterizadas pelo PAGE (BANK et al., 1991); estes surgem de glicosilações parciais do produto do gene primários seguido de desaminação. IEF e PAGE têm sido usados para estudar a herança polimórfica da α -amilase (BEELEY, 1991; BANK et al., 1991), e para separar as isoenzimas pancreáticas e salivares no soro (BEELEY, 1991). Apesar da principal função da α -amilase ser a digestão do amido, ela também se liga a streptococcus pode, ale disso, estar envolvida com o metabolismo bacteriano (BEELEY, 1993).

Apesar das aplicações clínicas da eletroforese das proteínas salivares de humanos estiveram limitados pela complexidade do polimorfismo das principais proteínas salivares, agora caracterizadas, esses achados junto aos novos procedimentos eletroforéticos poderiam facilitar o desenvolvimento dessa área. A análise eletrofórica de polimorfismos também parece atrativa como bases futuras para estudos forenses e antropológicos (BEELEY, 1993).

Alguns estudos têm utilizado SDS-PAGE para comparar os perfis eletroforéticos das salivas parótidas através da estimulação simpática e parassimpática e os efeitos da corticoides/catecolaminas em associação a adrenalectomia (ANDERSON et al., 1984; JOHNSON et al., 1987; PROCTOR e DULING., 1982).

Ekstrom et al., (1996), investigou se perfil das proteínas salivares produzidas em resposta aos componentes NANC (secreção não adrenérgica e não colinérgica) diferem daquela que ocorre em resposta ao efeito adicional de acetilcolina (sob a estimulação do nervo parassimpático na ausência de atropina), ou da infusão de betanechol. Seus resultados mostraram que o padrão do SDS-PAGE confirmou um aumento de 4X na [proteína] pela secreção NANC sem alterações na distribuição das proteínas, e que as alterações associadas às respostas secretórias são quantitativas em vez de qualitativas. Além disso, as proteínas da saliva parótida de ratos são marcadamente influenciadas pelo tipo de estimulação usada para evocar a secreção, mas as alterações observadas também foram quantitativas em vez de qualitativas. Ao contrário, Proctor e Cunningham, (1988), sugerem uma resposta diferente para amilase e proteínas ricas em prolina na ausência de estímulos simpáticos.

2.4 Mecanismo de Secreção Salivar

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

O modelo descrito por Thaysen e seus co-autores para descrever a secreção salivar são divididos em dois estágios: no primeiro estágio, as células acinares produzem uma secreção primária isotônica, no segundo, a secreção

primária é modificada durante sua passagem através do ducto. O ducto excretório modifica a secreção primária pela extração de Na^+ e Cl^- e adição de K^+ e HCO_3^- na saliva (SCHNEYER et al., 1972, NAUNTOFTE., 1992). Como a saliva flui através do sistema de ductos esta se torna mais hipotônica, pois o ducto epitelial é relativamente impermeável à água (NAUNTOFTE., 1992, MARTINEZ., 1987). O resultado final é uma saliva altamente hipotônica (25mEq/L NaCl) que entra na cavidade oral (THAYSEN et al., 1954).

2.4.1 Mecanismos controladores da secreção salivar

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

2.4.1.1 Controle Neural

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

Embora a secreção salivar normal seja dependente da cooperação entre os nervos simpáticos e parassimpáticos, o controle nervoso da secreção salivar não é idêntico para todas as glândulas salivares. As secreções salivares das glândulas sublinguais e mucosas secundárias são principalmente extraídas em resposta à estimulação colinérgica, considerando que as secreções das outras glândulas são evocadas pela inervação adrenérgica. Sabe-se que o impulso nervoso parassimpático cria o principal estímulo para a secreção salivar em geral (SCHNEYER et al., 1972). A estimulação parassimpática resulta em um fluxo de saliva que contém baixos níveis de componentes orgânicos e inorgânicos (BAUM, 1987; ASKING e EMMELIN, 1985). Por outro lado, a estimulação simpática produz saliva com baixo volume, mas com altos níveis de proteínas e K^+ (BAUM,

1987; PILARDEAU et al., 1990). Além disso, a saliva evocada pela ação de mediadores adrenérgicos geralmente tem um alto conteúdo orgânico e certo nível de sal inorgânico também é maior que o da saliva evocada pela estimulação colinérgica (SCHNEYER et al., 1972; BAUM, 1987). O alto conteúdo orgânico da saliva evocada pela estimulação adrenérgica pela atividade do adenilado ciclase inclui a elevação do nível de proteína total, e especialmente a enzima digestiva α -amilase (SPEIRS et al., 1974). Os níveis de componentes inorgânicos Ca^{++} K^{+} ou KCO_3 , são usualmente alto na saliva evocada pela estimulação simpática (SCHNEYER et al., 1972).

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

2.4.1.2 Duração e Intensidade do Estímulo

A composição da saliva muda consideravelmente com a duração da estimulação da glândula salivar. Os níveis de proteínas totais, Ca^{++} e HCO_3 e pH aumentam com a duração do estímulo, considerando que os níveis de cloro diminuem (DAWES, 1974). A alteração na composição da saliva coletada depois da mudança na intensidade ou duração da estimulação parece ser causada por mudanças na permeabilidade da membrana das células secretoras. A mudança na permeabilidade altera a taxa na qual os eletrólitos são liberados destas células (SCHNEYER et al, 1972).

2.5 Efeito do Exercício na Secreção e Composição Salivar

2.5.1 Taxa de fluxo

De acordo com muitos estudos, a taxa de fluxo salivar parece modificar durante as atividades físicas (DAWES, 1981; BARDON et al., 1983).

Contudo as interpretações dos resultados desses estudos são algumas vezes difíceis devido às limitações de algumas metodologias, principalmente a respeito dos protocolos de exercícios e procedimentos na coleta da saliva.

Os dados disponíveis relativos à resposta do fluxo salivar durante exercícios intensos e de curta duração, são controversos. Alguns autores acharam nenhum efeito na taxa de fluxo salivar em resposta a séries curtas de exercício á intensidades máximas e submáximas (PILARDEAU et al., 1990; DAWES, 1981), ao passo que outros informaram um aumento de até 2 vezes (BARDON et al., 1983), ou até mesmo declíneos (MACKINNON et al., 1993) em resposta a exercícios aeróbios intensos. Este último achado pode ser explicado pelo aumento da atividade simpática durante exercício intenso, desde que a inervação simpática causa vasoconstrição nas arteríolas que irrigam as glândulas salivares, resultando em um baixo volume salivar.

Durante exercícios prolongados de intensidades baixas e moderados (abaixo de 60% $\text{VO}_2\text{máx}$), a secreção salivar não parece ser significativamente modificada (PILARDEAU et al., 1990; BARDON et al., 1983). Em intensidades maiores [acima do limiar anaeróbio (LAN)], a secreção salivar diminui. Vários fatores associados com exercícios prolongados de alta intensidade, como o aumento da atividade β -adrenérgica, desidratação, evaporação da saliva pela hiperventilação, embora este último seja menos provável, tem sido proposto para explicar a baixa secreção salivar em cargas de trabalho altas e prolongadas.

2.5.2 Composição protéica

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

2.5.3 Lactato

Alguns estudos analisaram a resposta do lactato salivar ao exercício (BARDON et al., 1983; SEGURA et al., 1996). Bardon et al, demonstraram que o lactato salivar aumenta em indivíduos não treinados após exercício anaeróbio em bicicleta ergométrica. Nenhuma alteração foi encontrada nos níveis de lactato salivar após exercício aeróbio, comparado com os níveis de repouso.

Estudos sugerem que o uso das avaliações do lactato salivar como indicador relevante na determinação do potencial de atletas na produção do lactato e na execução de exercícios anaeróbios. Segura et al., (1986) mostraram alta correlação entre os níveis de lactato salivar e aqueles dos capilares sanguíneos durante exercício em cicloergômetro. Sendo assim, a determinação do lactato pela saliva poderia ser usada com uma alternativa para determinação do lactato sanguíneos na avaliação funcional de atletas.

2.5.4 Imunoglobulinas

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

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

Vários estudos têm investigado o efeito do exercício de intensidade moderada em atletas recreacionais (indivíduos moderadamente treinados em lugar de atletas altamente treinados) usando esteira ou cicloergômetro em laboratório. Essa linha de investigação é significativa, dado as implicações potenciais para a prescrição de programas de exercício moderados na comunidade geral. Vários estudos têm mostrado que exercícios de intensidade moderada não levam a mudanças significativas nas concentrações de IgA salivar

pós-exercício (BLANNIN et al., 1998, MACKINNON e HOOPER, 1994; BRATTHALL e WIDERSTROM, 1985; MCDOWELL et al., 1991).

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

Em contraste com a IgA salivar, as outras classes de imunoglobulinas na saliva tem recebido muito pouca atenção. Concentração de IgG salivar são inalterados pelo exercício em ciclistas (MACKINNON e HOOPER, 1994), nadadores de elite (GLEESON et al., 1995) e em voluntários saudáveis em ciclismo exaustivo (MACKINNON et al., 1993). As concentrações de IgM salivar diminuíram após o exercício na maioria dos estudos e paralelo a diminuição na concentração de IgA salivar. A concentração de IgM salivar tem mostrado diminuir após sessões de treinamento em nadadores de elite (GLEESON et al., 1995) e pós duas horas de ciclismo exaustivo em ciclistas de competição (MACKINNON et al., 1989). A concentração de IgM foi também menor no time de jogadores hockey feminino durante a competição comparado com sessões de treinamento (MACKINNON e JENKINS et al., 1993). A taxa de secreção de IgM na saliva foi inalterada após treinamento em Kayakers de elite, mas diminuiu no grupo de atletas recreacionais após ciclismo supramáximo (MACKINNON et al., 1993).

2.5.5 Cortisol

Alguns autores consideram que os níveis salivares de cortisol sejam bons indicadores da resposta adrenocortical do exercício, desde que os níveis de cortisol salivar reflitam os níveis livres de cortisol no plasma e que sua avaliação representa uma vantagem metodológica sobre a avaliação total do cortisol no plasma (STUPNICKI e OBMINSKI, 1992; LÓPEZ et al., 1993; PORT, 1991). Além disso, os níveis salivares de cortisol não são alterados por variações na taxa de fluxo (VINING et al, 1983). Durante o exercício, os níveis de cortisol no soro e na saliva são bastante similares (STUPNICKI e OBMINSKI, 1992; VINING et al., 1983; COOK et al., 1987) e o cortisol salivar poderia então ser usado para avaliar a resposta dos glicorticóides ao esforço (STUPNICKI e OBMINSKI, 1992; OBMINSKI e STUPNICK, 1990).

Tanto os níveis salivares (LÓPEZ e MARIN, 1995) quanto os sanguíneos (VANHELDER et al., 1985) de cortisol aumentam linearmente com a intensidade do exercício. Quando certa intensidade é alcançada, esses aumentos perdem sua linearidade (PORT, 1991). Em muitos indivíduos, o ponto de inflexão de aumento dos níveis sanguíneo e salivar de cortisol coincide com o linar anaeróbio (PORT, 1991; KINDERMANN et al., 1982). Durante exercício progressivo, a resposta do cortisol salivar é significativamente relacionada com o lactato sanguíneo (PORT, 1991). O aumento nos níveis de cortisol e lactato podem tanto ocorrer como resultado da atividade simpática, como pelo aumento das catecolaminas do sangue, as quais aumentam em intensidades de exercício abaixo do LAN.

2.5.6 Eletrólitos

Salminen e Kontinen (1963) estudaram o efeito do exercício submáximo prolongado nos níveis de eletrólitos salivares e observou significativo aumento nos níveis de Na^+ durante o esforço, embora nenhuma alteração nos níveis de K^+ foi observada. Os níveis de Na^+ retornaram aos valores basais duas horas após o exercício. A razão aumentada de Na^+/K^+ foi positivamente correlacionada com o aumento dos níveis de proteínas salivares, e indicado pelo aumento na permeabilidade da barreira plasma-saliva durante o exercício.

Ben-Aryed et al., (1984) mostraram aumento nos níveis de K^+ e Mg^+ após 30s de esforço supramáximo em teste anaeróbio de Wingate. Esses resultados foram atribuídos ao envolvimento da atividade simpática durante exercício anaeróbio. Os níveis de Na^+ e Ca^{++} na saliva, estiveram inalterados pelo exercício. Foi sugerido, então, diferentes mecanismos de secreção para os vários eletrólitos na saliva.

Chicharro e colaboradores em 1994 e 1995 estudaram a relação entre o LAN e as variações nos níveis salivares de eletrólitos (Na^+ , K^+ e Cl^-), os quais ocorrem em resposta ao exercício progressivo. Estes estudos sugerem que os níveis de Na^+ e Cl^- apresentem uma resposta dual ao exercício: eles diminuem ou se mantêm estáveis durante as fases iniciais do exercício, até que uma certa intensidade (correspondendo ao LAN_{sa}) de exercício seja atingida, depois eles começam a apresentar um aumento. Além disso, os níveis de K^+ declinam gradualmente durante protocolo de exercício progressivo.

3 Eletromiografia

A eletromiografia é o estudo da função muscular através da averiguação do sinal elétrico que emana do músculo (BASMAJIAN e DE LUCA, 1985). Segundo Portney (1993), ela é essencial no estudo da atividade das unidades motoras, atualmente empregada nas avaliações de doenças neuromusculares ou traumatismo, e também como instrumento cinesiológico para o estudo das funções musculares.

A estimulação elétrica e a captação de potenciais elétricos produzidos pelo músculo durante uma contração voluntária têm sido consideradas como fundamentais para estudos anatômicos, cinésiológicos e clínicos da atividade muscular, já que fornecem mais informações sobre a fisiologia de um músculo ou grupos musculares, e também possibilitam conclusões mais claras da sua anatomia (BASMAJIAN e DE LUCA, 1985)

A possibilidade de estudos mais objetivos sobre o comportamento elétrico dos músculos pode ser vislumbrada em razão dos avanços tecnológicos, principalmente na área da informática, pois permitiu a instrumentalização de um modelo matemático, introduzido por De Luca e Dick, (1975) apud Basmajian e De Luca (1985), para análise quantitativa do sinal eletromiográfico, correlacionando com aspectos básicos da contração muscular, através do uso de equipamentos eletromiográficos computadorizados e *software* adequado.

A Eletromiografia leva em conta, fundamentalmente, o potencial de ação de cada músculo, medido em microvolts (μV), o que nos faz acreditar que esta técnica traz resultados mais próximos da realidade do que os métodos tradicionais.

4 Produção/remoção do lactato e fadiga

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

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

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

Katz e Sahliln (1990) resumiram dados experimentais e razões teóricas que suportam a concepção que a produção de lactato seja dependente de O_2 . Eles argumentam que quanto o fornecimento de oxigênio é limitado, a respiração mitocondrial é estimulada pelo aumento de adenosina difosfato (ADP), fosfato inorgânico (Pi), e pela forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotideo (NADH). Estes favorecem a estimulação da glicólise, a qual aumenta a formação de NADH citossólico, o qual modifica o ponto de equilíbrio da enzima lactato desidrogenase (LDH) levando a formação do lactato.

Segundo a hipótese do limiar anaeróbico de Wasserman et al., (1986), quando a intensidade de exercício aumenta e mais unidades motoras são recrutadas, o requerimento de oxigênio do músculo em contração aumenta. Numa

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

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

Connett et al., (1985) usando a técnica da mioglobina criomicrospectroscopia para obter a distribuição da pO_2 muscular em repouso e durante contrações musculares, obteve um nível crítico de pO_2 mitocondrial (pO_{2crit}) onde abaixo deste nível, o funcionamento do citocromo aa3 é reduzido; ou seja, a capacidade de gerar ATP pelo metabolismo oxidativo é reduzida. Em mitocôndrias isoladas, a pO_{2crit} tem sido estimada para ser entre 0,1 e 0,5 mmHg. Através de estimulação elétrica muscular, numa frequência de estimulação de 1/s e 4/s, não foi encontrada pO_2 mitocondrial menor que dois mmHg durante o estado estável ou na transição do repouso para o exercício. Essas frequências de contrações musculares requisitaram de 10 a 70% do consumo máximo de oxigênio

respectivamente. A concentração de lactato aumentou de 1mM/L em repouso para 2 mM/L na frequência de 1/s e para 6 mM/L na frequência de 4/s. Baseados nesses dados pode-se sugerir que a concentração de lactato aumenta, mesmo com suprimento adequado de O_2 à mitocôndria. Dessa forma, o acúmulo de lactato pode ser causado por outros fatores que não a limitação de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons.

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

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

Apesar de muita controvérsia sobre as causas do acúmulo de lactato durante o exercício, existe consenso na literatura de que a partir de determinada intensidade do exercício crescente, o mesmo começa a acumular-se, chegando a provocar exaustão caso atinja concentrações elevadas. Entretanto, a intensidade na qual começa a ocorrer o acúmulo de lactato denota grande controvérsia, seja

em relação à nomenclatura do fenômeno ou a sua metodologia de avaliação (WELTMAN et al., 1994).

O ácido láctico é 99% dissociado em lactato e prótons H^+ em pH fisiológico. Muitos trabalhos têm argumentado que os efeitos prejudiciais do ácido láctico sobre a performance são devido aos prótons e não ao lactato (FITTS, 2003), e que o declínio na produção de força muscular máxima está correlacionado com a queda no pH muscular (SAHLIN, 1992). Entretanto, nos últimos dez anos o efeito da acidose como importante causador da fadiga tem sido bastante contestado (WESTERBLAD et al., 2002). Estudos mostram que o efeito do aumento da concentração dos prótons H^+ na redução da sensibilidade de cálcio, tensão máxima e velocidade de contração em fibras musculares “descascadas” *in vitro* são ausentes quando o experimento é executado a temperaturas mais próximas daquelas encontradas fisiologicamente. Há relatos que a acidose muscular não reduz a glicólise/glicogenólise durante exercício intenso em homens (BANGSBO et al., 1996).

No lugar da acidose, estudos com fibras musculares “descascadas” apontam o fosfato inorgânico (Pi) como principal causa da fadiga (WESTERBLAD et al., 2002).

5 Limiar Anaeróbio

Pesquisas a respeito da capacidade aeróbia, já vêm sendo realizadas de longa data. Wasserman et al., (1973) usaram o termo limiar anaeróbio (LAN) para descrever o ponto de inflexão do lactato, pois percebeu que o aumento súbito na [La] sanguíneo era devido à hipóxia do tecido muscular e pelo aumento da glicólise anaeróbia. Alguns pesquisadores desafiam a concepção do limiar anaeróbio e a idéia de que a hipóxia muscular seja a única causa do limiar de lactato (LL) (BROOKS, 1985). Mader e Heck et al., (1986) definiram o termo “Limiar-aeróbio-anaeróbico” para identificar a intensidade do exercício correspondente à 4mmol/L de lactato sanguíneo. No mesmo ano Davis et al., (1976) encontram uma alta correlação entre Limiar Ventilatório (LV) e Limiar de Lactato (LL). O LL foi definido no estudo de Wasserman (1984), como sendo “o nível de VO_2 durante o exercício no qual a energia aeróbia é suplementada por mecanismos anaeróbicos”. E redefinido como sendo “o ponto de inflexão da

lactatemia, caracterizado pela transição do aumento linear para exponencial" (WASSERMAN et al., 1986). Sendo assim, o limiar anaeróbio representa o ponto crítico no qual modificações metabólicas provocam uma transição da demanda energética do exercício aeróbio para o anaeróbio. Essa transição para o metabolismo anaeróbio durante a contração muscular envolve uma variedade de fatores tais como: o tipo de fibra muscular recrutada, mobilização de combustível, resposta hormonal, cardio-circulatório e parâmetros respiratórios (BROOKS, 1985; KATZ e SAHLILN, 1990; PODOLIN et al., 1991).

Com a descoberta do aumento da atividade adrenérgica durante um exercício submáximo com incremento de cargas (GLEIN et al., 1984; LEHMANN et al., 1985), sugeriu-se que este aumento estava correlacionado com o aumento do lactato sangüíneo, sendo "*o ponto de aumento da concentração de epinefrina plasmática*" (LAN_{epi}) podendo estar correlacionado ao limiar de lactato sangüíneo (GREEN et al., 1983; MAZZEO e MARSHALL, 1989), sendo mais tarde confirmado (NEDERFORS e DAHLOF, 1992; CHICHARRO et al., 1994).

O limiar anaeróbio é um importante determinante da tolerância ao exercício prolongado devido aos prejuízos musculares e sistêmicos provenientes da concentração elevada de lactato. Sabe-se que a acidose láctica no músculo acelera a quebra da creatina fosfato e inibe a glicólise, enquanto que a diminuição no pH interfere na ligação do cálcio para a contração muscular (HULTMAN e SAHLIN, 2001).

Algumas metodologias tem sido proposto para estimar o limiar anaeróbio, sendo algumas invasivas e outras não invasivas. Dentre os métodos invasivos estão a análise do lactato sanguíneo (KINDERMANN et al, 1979), dosagens glicêmicas (SIMÕES et al., 1998), análise das catecolaminas plasmáticas (MAZZEO e MARSHALL, 1989) e dentre as não invasivas estão as análises ventilatórias (WASSERMAN e MCLLORY, 1964) salivares (CALVO et al., 1997; CHICHARRO et al., 1998) e eletromiográficas (LUCIA et al., 1999).

5.1 Métodos de análise do limiar anaeróbio

5.1.1 Análise do lactato sanguíneo

O limiar anaeróbio pode ser detectado através de diversos protocolos de testes crescentes com estágios variados de duração, sendo que a intensidade na

qual ocorre o ponto de inflexão na curva do lactato sanguíneo é a intensidade do limiar anaeróbio (WASSERMAN et al., 1986), ou do limiar aeróbio (KINDERMANN et al., 1979; VILLIGER et al., 1995). O mesmo ponto é definido por Farrell et al., 1979, como OPLA (Onset of Plasma Lactate Accumulation). Entretanto, Coyle et al., 1983, define como limiar anaeróbio a intensidade de exercício na qual a concentração de lactato aumenta 1 mM acima da linha de base ($\Delta 1\text{mM}$).

5.1.2-Análise das catecolaminas plasmáticas

Alguns estudos tem relacionado as concentrações de lactato sanguíneo com as concentrações de catecolaminas plasmáticas (adrenalina e noradrenalina), sugerindo que o ponto de inflexão do lactato sanguíneo ocorra simultaneamente com o das catecolaminas, durante teste de esforço progressivo, sendo assim, a mensuração das catecolaminas seria um método válido na determinação do limiar de lactato (MAZZEO e MARSHALL, 1989; PODOLIN et al., 1991; SCHNEIDER et al., 2000).

Ainda permanece obscuro que os mecanismos subjacentes a ativação simpática em indivíduos saudáveis durante exercício estão relacionados com a co-ativação dos músculos esqueléticos e do sistema neuro-endócrino pelo 'comando central' (VISSING et al., 1996), ou pela ativação simpática reflexa das fibras aferentes III-IV pelas alterações de pH musculares/extracelulares (SCHNEIDER et al., 1992). A relação precisa entre a ativação simpática durante o exercício e a produção do lactato muscular ainda estão em debate. Sabe-se que a epinefrina age através de receptores β -adrenérgicos e AMP cíclico ativando a fosforilase e aumentando a glicogenólise muscular (CHASIOTIS, 1988; STAINSBY e BROOKS, 1990). Como a glicogenólise muscular está aumentada, a taxa de produção de lactato também aumenta e este é liberado para circulação. Além disso, a infusão de Epi em humanos aumenta tanto a [lactato] em repouso (STATEN et al., 1987; SJOSTROM et al., 1983) quanto em exercício (GAESSER et al., 1994; JANSSON et al., 1986); assim como bloqueadores β -adrenérgicos mostraram reduzir tanto a taxa de glicogenólise muscular em humanos (JANSSON et al., 1986) como o "turnover" de lactato durante exercício em animais (ISSEKUTZ, 1984). Além disso, Brooks e Gregg (1988) encontraram alta correlação ($r=0.97$) entre o "turnover" de lactato e a [Epi] plasmática em ratos

durante exercício. Esses estudos sugerem uma relação casual entre o aumento na [Epi] e a concentração de lactato durante exercício submáximo. Assim argumenta-se que o aumento na [Epi] plasmática durante exercício graduado seja o fator primário que influencia o LL (BROOKS, 1985; MAZZEO e MARSHALL, 1989; PODOLIN et al., 1991)

Schneider et al., (2000) examinaram a resposta das catecolaminas plasmáticas e lactato sangüínea em exercício de perna e braço e concluiu que o “breakpoint” da [Epi] plasmática ocorre de maneira idêntica e simultaneamente com o LL, seja em exercício de perna ou de braço, e que os limiares de catecolaminas e de lactato mostraram ser mais baixos em exercícios de braço que em exercícios de perna.

Segundo Brooks (1985) o aumento na [NE] plasmática poderia contribuir para o desenvolvimento do LL por causar vasoconstrição e subsequente redistribuição do fluxo sanguíneo de órgãos e tecidos que normalmente removem o lactato do sangue; sendo a taxa de remoção do lactato do sangue um dos vários mecanismos que se tem oferecido para explicar o LL. Entretanto, Weltman, 1994, mostrou que o limiar de epinefrina é freqüentemente antecedido pelo limiar de lactato, e sugere que embora a epinefrina influencie o acúmulo de lactato, o limiar de Epi não necessariamente causa o limiar de lactato.

O mesmo não ocorre quando a os níveis de catecolaminas são relacionados com a concentração de lactato em populações especiais como: portadores da síndrome de apnéia obstrutiva do sono (OSAS) (BONANNI et al., 2004) ou em miopatias mitocondriais (SICILIANO et al., 1999).

Bonanni et al., (2004) avaliaram a atividade catecolaminérgica e a [lactato] durante exercício em pacientes normotensos com síndrome de apnéia obstrutiva do sono (OSAS) com o objetivo de avaliar o metabolismo oxidativo desses pacientes, avaliando e relacionando a cinética do lactato e o limiar anaeróbio com os níveis de catecolaminas. Obsevou-se uma produção anormal de lactato durante exercício em OSAS, possivelmente devido a algumas modificações no metabolismo muscular. Enquanto isso, a atividade catecolaminérgica foi anormalmente aumentada em repouso, parecendo não exercer nenhuma contribuição significativa na [lactato] durante o exercício em pacientes OSAS.

5.1.3 Análise da ventilação pulmonar

Em 1964, Wasserman e Mcllory sugeram que as avaliações das trocas gasosas pudessem ser usadas para determinar o ponto de início do acúmulo de lactato. Seu princípio consistiu na instalação da hipóxia mitocondrial em exercícios submáximos, o qual desvia o metabolismo, antes aeróbio, para anaeróbio. O ácido láctico formado pelo músculo em exercício é rapidamente difundido e transportado para a circulação, onde é tamponado pelo íon NaHCO_3 (bicarbonato de sódio). O resultado dessa reação é a formação do ácido carbônico (H_2CO_3), que na presença da enzima anidrase carbônica se dissocia em gás carbônico (CO_2) e água, aumentando assim a pCO_2 sanguínea. Como o controle da PCO_2 é realizado pelo sistema respiratório, este refletirá numa alteração do padrão ventilatório.

Desta maneira, a ventilação que possui um aumento linear com a intensidade do exercício até o limiar anaeróbio (LAN), passa a ter um aumento exponencial, sendo que a passagem da curva da ventilação da forma linear para a exponencial é uma das formas de detecção do limiar anaeróbio por mecanismos ventilatórios não invasivos. A produção de CO_2 , que antes do LAN aumentava de forma linear devido a sua produção ser “puramente” respiratória (ciclo de krebs), passa também a aumentar de forma exponencial pós LAN, pois soma-se ao CO_2 respiratório ao CO_2 produzido pelo tamponamento do ácido láctico (CO_2 metabólico). Dessa maneira, a curva da VCO_2 também pode ser usada para detectar o LAN (BALDISSERA, 1992).

Hagberg et al., (1982), estudaram a relação entre a concentração de lactato sanguíneo e a ventilação pulmonar em pacientes com síndrome de McArdle. Estes indivíduos não apresentam a enzima fosforilase muscular (DEVLIN, 1997) responsável pela quebra do glicogênio em glicose-1-fosfato, desta forma não sendo capazes de intensificar a via glicolítica, e conseqüentemente aumentar as concentrações de lactato sanguíneo e íons H^+ durante o exercício. Os voluntários avaliados exibiram o limiar ventilatório na ausência de alteração do lactato e pH sanguíneo. Concluiu-se então, que a hiperventilação e os limiares ventilatório poderiam ocorrer sem que houvesse acidose metabólica, ou limiar metabólico.

5.1.4 Análise da saliva

A saliva humana é uma ferramenta de diagnóstico, sendo facilmente obtida por técnicas não invasivas e sendo esta indicadora da resposta fisiológica, de diferentes tecidos do corpo e sistemas, pelo esforço físico (CALVO et al., 1997; CHICHARRO et al., 1998; HOFMAN, 2001). Além disso, alguns componentes salivares como lactato, cortisol, óxido nítrico, proteínas da saliva total, eletrólitos, entre outros; vem sendo bastante utilizados no monitoramento da capacidade física do indivíduo, sendo que algumas dessas variáveis têm se mostrado correlacionar com os níveis de lactato no sangue (CHICHARRO et al., 1994, 1995, 1998, 1999; WALSH et al., 1999; CHATTERTON et al., 1996; LJUNGBERG et al., 1997).

5.1.4.1-Proteína total

É sugerido que há na saliva mais de 200 tipos de proteínas (MARSHALL, 1984 apud JENZANO et al., 1986). No trabalho de Rantonen e Meurman (2000), que avaliaram em 16 homens e 14 mulheres (média de idade 24,2 e 21,7 e desvio padrão 2,9 e 1,5 respectivamente) a variação de amilase, proteína total, imunoglobulinas, lisozima e albumina na saliva total estimulada durante o dia (08:00, 11:00, 14:00, 17:00 e 20:00 horas). Sugeriram que as variações da concentração na Imunoglobulina do tipo A (IgA), albumina, amilase e proteína total estão sujeitas a uma variação pequena, sendo a proteína total correlacionada positivamente com a amilase salivar.

As pesquisas de Walsh et al., (1999) tiveram como objetivo a avaliação do efeito do esforço agudo em um exercício intenso intermitente na concentração salivar da IgA, da atividade da alfa-amilase e da concentração proteína total. Constataram que a proteína total aumentou 3 vezes ($p < 0.01$), em relação ao basal, durante um exercício contínuo e retornou, 2,5 horas pós-exercício, a níveis de pré-exercício.

Bortolini, (2003) em sua dissertação realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU observaram biomarcadores salivares do exercício físico. Neste estudo encontraram um aumento não linear da atividade da amilase, como também aumento exponencial da concentração de proteína total da saliva, onde ambos os limiares correlacionaram com o limiar de lactato sanguíneo.

5.1.4.2-Atividade da alfa-amilase

Chatterton e colaboradores (1996) concluíram que a concentração da alfa-amilase salivar é prediativa de níveis plasmáticos de catecolaminas, particularmente da norepinefrina, sob uma variedade de condições de estresse, e pode ser um meio mais direto e mais simples para mensurar a atividade das catecolaminas do que o batimento cardíaco. Calvo e colaboradores (1997) determinaram o limiar anaeróbico pela análise da concentração de amilase salivar durante teste de exercício em laboratório. Chicharro e colaboradores (1998) determinam que limiar de anaeróbico da amilase salivar (LAN_{AMY}) é o ponto durante o exercício no qual os níveis da alfa-amilase salivares começam aumentar acima dos níveis basais.

Em estudo, realizado durante exercício físico intermitente de competição, constatou-se um aumento de cinco vezes na atividade da alfa-amilase, com sua taxa de secreção sendo menor imediatamente no pré-exercício do que em qualquer outro instante, sendo este fato explicado por um possível estresse fisiológico antecipado (WALSH et al., 1999).

5.1.4.3-Eletrólitos

Chicharro et al., (1999) tiveram como objetivo conhecer porque o exercício pode causar mudanças na concentração de componentes salivares, tais como amilase, Na, e Cl. Amostras de concentrações de Fe, Mg, Sc, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Sr, Ag, Sb, Cs, e Hg foram determinadas por espectrometria de massa de plasma. Já as concentrações de Ca e Na foram determinadas por espectrometria de absorção atômica. Concluíram que o exercício físico intenso induz mudanças nas concentrações de somente três (Na, Mg e Mn) dos dezesseis elementos analisados em amostra de saliva.

Ljungberg et al., (1997) analisaram as mudanças na saliva e soro após exercício extenuante prolongado. A concentração salivar de cloreto, fosfato e potássio são significativamente maiores após que antes da corrida. Eles concluíram que houve várias mudanças na composição da saliva logo após a maratona, mas muitos dos valores retornaram à linha basal após uma hora de descanso. No entanto, os valores de sódio, cálcio, fosfato, peroxidase salivar, amilase e IgA salivares estiveram ainda elevados uma hora após a corrida.

5.1.5 Análise do sinal eletromiográfico

Eletromiografia de superfície (EMG) é extensamente usada para quantificar o nível de ativação dos músculos ativos e detectar os sinais de fadiga muscular. Por exemplo, pensava-se que um aumento na raiz quadrada média (RMS), um índice global da atividade EMG, poderia refletir o recrutamento de unidades motoras adicionais assim como um aumento na taxa de codificação da unidade motora para compensar o déficit de contractilidade resultante da perda das unidades motoras fadigadas (MORITANI e DEVRIES, 1978). É interessante notar que alguns estudos prévios (MORITANI e DEVRIES, 1980, NAGATA et al., 1981; DEVRIES et al., 1982; VIITASALO et al., 1985) mostraram a possibilidade de o LAN ser estimado pelo uso de técnicas convencionais de eletromiografia integrada. A contração muscular a certa tensão submáxima causa mudanças fisiológicas no sistema neuromuscular os quais se manifestam pelo aumento da contribuição neural para o músculo. A quantidade desse impulso neural é freqüentemente medida pela EMGi (EDWARD e LIPPOLD, 1956; VIITASALO e KOMI, 1977; PETROFSKY., 1979; MORITANI et al., 1982, VIITASALO et al., 1985, SIHVONEN et al., 1988). Especula-se o recrutamento progressivo de unidades motoras adicionais poderia ocorrer para compensar o déficit das unidades motoras fadigadas (HANON et al., 1998).

Em exercícios progressivos de bicicleta vários estudos EMG relataram um único limiar EMG (EMG_{lan_1}) no músculo quadríceps (NAGATA et al., 1981; CHWALBINSKA-MONETA et al., 1998) e outro dois limiares eletromiográficos (LUCIA et al., 1999) de acordo com o desempenho do voluntário. Esses limiares eletromiográficos são explicados pelo aumento da contribuição das unidades motoras de contração rápida para manter a fonte de energia requerida para a contração muscular (ENOKA e STUART, 1992).

Segundo Lucia et al., (1997) a eletromiografia de superfície é válida para quantificar a atividade total de trabalho muscular e que a eletromiografia de superfície integrada (EMGi) é um método não invasivo aceitável para estimar a fadiga muscular. O aumento na EMGi tem mostrado refletir o recrutamento adicional de unidades motoras e o aumento na taxa de codificação da unidade motora como um aumento na força de contração muscular.

Sugere-se que o limiar eletromiográfico (EMG_{lan}) ocorra no músculo vasto lateral (MORITANI e DEVRIES, 1980; NAGATA et al., 1981; VIITASALO et al., 1985; TAKAISHI et al., 1992) reto femoral (VIITASALO et al., 1985) e vasto medial (VIITASALO et al., 1985) durante exercícios de incremento de carga em cicloergômetro. De acordo com Nagata et al., (1981) e Viitasalo et al., (1985) tal limiar representaria o ponto no qual houvesse um aumento na contribuição das unidades motoras de contração rápida para manter o suprimento de energia requerido para a contração muscular.

Em uma série de estudos eletromiográficos (EMG), Moritani e DeVries (1980) demonstrou que um aumento abrupto na eletromiografia integrada (EMG_i), representando mudanças no recrutamento de unidades motoras (UM) e/ou na frequência de disparo de UM durante exercício progressivo, correlaciona significativamente com a captação de oxigênio (VO_2) no LAN ($r=0.97, n=36$). Outros dois estudos confirmaram estes achados (NAGATA et al., 1981; VIITASALO et al., 1985). DeVries et al., (1982, 1987) empregou o método de EMG_i para estimação da capacidade de trabalho físico como um ponto final definido pelo início da fadiga muscular (PWC_{FT}). Junto ao uso do conceito de força crítica (CP) entendido como esforço total do corpo, (Moritani et al., 1981). DeVries et al. (1982, 1987) demonstraram significativa correlação entre PWC_{FT} , LAN, CP, e o início de acúmulo de lactato sanguíneo (OBLA).

DeVries et al., (1982) usaram a taxa de aumento da EMG_i (EMG_i slope) a cada quatro taxas de força constantes para identificar PWC_{FT} . Este estudo mostrou que PWC_{FT} pode ser reproduzível em homens jovens e é válido quando comparado com critérios tais como LAN e CP. Os resultados mostraram que houve uma correlação significativamente alta entre LAN e PWC_{FT} . A magnitude da correlação encontrada entre essas variáveis sugeriu que aproximadamente 67.7% da discrepância do LAN podemos ser relatados pela PWC_{FT} .

Baseado nestas informações o presente trabalho buscou avaliar as alterações que ocorrem na atividade elétrica do músculo vasto lateral (VL) e vasto medial (VM), na cinética do lactato sanguíneo e nos biomarcadores salivares durante exercício progressivo com cargas crescentes, além de verificar a existência dos limiares eletromiográficos e salivares e sua relação com o limiar anaeróbio de lactato.

5.2 Referências Bibliográficas

1. ABRAHAMSON, M.; BARRETT, A.J.; SALVESEN, G.; GRUBB, A. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. **J Biol Chem.** v. 25, nº 24, p. 11282-9, Aug, 1986.
2. ANASTASI, A.; BROWN, M.A.; KEMHAVI, A.A.; NICKLIN, M.J.; SAYERS, C.A.; SUNTER, D.C.; BARRETT, A.J. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. **Biochem. J.** v. 211, nº 1, p.129-38, Apr, 1983.
3. ANDERSON, L.C.; GARRETT, J.R.; JOHNSON, D.A.; KAUGGMSN, D.L.; KELLER, P.J.; THULIN, A. Influence of circulating catecholamines on protein secretion into rat parotid saliva during parasympathetic stimulation. **J. Physiol**, v.352, p.163–171, 1984.
4. ASKING, B.; EMMELIN, N. Amylase in parotid saliva of rats after sympathetic nervous decentralization. **Arch Oral Biol.** v. 30, nº 4, p. 337-9, 1985.
5. BALDISSERA, V. O estudo da variabilidade do limiar anaeróbico e frequência cardíaca de indivíduos sedentários e atletas durante exercício físico dinâmico em cicloergômetro, utilizando-se degraus e rampas corrigidas. Tese de Doutorado apresentada na faculdade de medicina de Ribeirão Preto – Univ. de São Paulo, 1992. (273 páginas)
6. BANK, R.A.; HETTEMA, E.H.; ARWERT, F.; AMERONGEN, A.V.; PRONK, J.C. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase. **Electrophoresis.** v. 12, nº 1, p. 74-9, Jan, 1991.
7. BARDON, A.; CEDER, O.; KOLLBERG, H. Cystic fibrosis-like changes in saliva of healthy persons subjected to anaerobic exercise. **Clin Chim Acta.** v. 133, nº3, p. 311-316, Oct, 1983.

8. BARTUAL, J. Fisiología Y fisiopatología parotídea. In: Clemente M, editor. Patología de La parótida. Valencia : Fundación García Muñoz, 1980: 27-40.
9. BASMAJIAN, J.V.; De LUCA, C.J. Muscles Alive: their function. Baltimore. 276-278, 1985.
10. BAUM, B.J. Neurotransmitter control of secretion. **J. Dent. Res.** v. 66, p. 628-632, 1987.
11. BEELEY, J.A. Fascinating families of proteins: electrophoresis of human saliva. **Biochem Soc Trans**, v. 21, nº1, p. 133-8, Feb, 1993.
12. BEELEY, J. A. Clinical applications of electrophoresis of human salivary proteins. **J. Chromatog.** v. 569, p. 261-280, 1991.
13. BEIRMAN, W.; YAMSHON, L.J. Electromyography in kinesiological evaluations. **Archs. Phys. Med.** v. 29, p. 206-211, 1948.
14. BEN-ARYED, H.; MIRION, D.; SZARGEL, R, et al. Whole saliva secretion rates in old and young healthy subjects. **J Dent Res**, v.63, p. 1147-81984.
15. BERG, JEREMY M.; TYMOCZKO, JOHN L.; STRYER, LUBERT. Biochemistry. New York: W.H. Freeman and Co.;2002.
16. BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; WSLSH, N.P.; CLARK, A.M.; GLENNON, L.; GLEESON, M. The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immol/Lunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. **Int J Sports Med.** v. 19, nº8, p. 547-552, Nov, 1998.
17. BONANNI, E.; PASQUALI, L.; MANCA, M.L.; MAESTRO, M.; PRONTERA, C.; et al. Lactate production and catecholamine profile during aerobic exercise in normotensive OSAS patients. **Sleep Medicine.** v. 5, p. 137-145, 2004.

18. BORTOLINI JR, M.A. Biomarcadores Salivares do Exercício Físico para Determinação do Limiar Anaeróbio Humano. Uberlândia, UFU, 2003. 130 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade Federal de Uberlândia, 2003.
19. BRATTHALL, D.; WIDERSTROM, L. Ups and downs for salivary IgA. **Scand J Dent Res.** v. 93, nº2, p.128-34, Apr, 1985.
20. BROOKS, G.A. Anaerobic threshold: a review of the concept and directions for future research. **Med Sci Sports Exerc.** v. 17, p. 22-31,1985.
21. BROOKS, G.A.; GREGG, S.G. Catecholamine stimulation decreases clearance. **Med. Sci Sports Exerc.** v. 20, p. S46, 1988.
22. BROOKS, G. A. Current concepts in lactate exchange. **Med Sci Sports Exerc.** v. 23, p. 895-906, 1991.
23. CALVO, F.; CHICHARRO, J.L.; BANDRÉS, F.; LUCIA, A.; PERES, M.; ÁLVARES, J.; MOJARES, L.L.; VAQUERO, A.F.; LEGIDO, J.C. Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. **Can. J. Appl. Physiol.** v. 22, nº 6, p. 553-561, 1997.
24. CAMERON, W.R.; JOHANSSON, L.; TENNVALL, J. Small cell carcinoma of the parotid. Fine needle aspiration and immunochemical findings in a case. **Acta Cytol.** v. 34, nº6, p. 837-41, Nov-Dec, 1990.
25. CHASIOTIS, D. Role of cyclic AMP and inorganic phosphate in the regulation of muscle glycogenolysis during exercise. **Mes. Sci. Sports Exerc.** v. 20, p. 545-550, 1998.
26. CHATTERTON, R.T.Jr.; VOGELSONG, K.M.; LU, Y.C.; ELLMAN, A.B.; HUDGENS, G.A. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. **Clin Physiol.** v. 16, nº4, p. 433-48, Jul, 1996.
27. CHICHARRO, J.L.; CALVO, F.; ALVAREZ, J.; VAQUERO, A.F.; BANDRES, F.; LEGIDO. Anaerobic threshold in children: determination from saliva analysis in field tests. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.**v. 70, nº6, p. 541-4, 1995.

28. CHICHARRO, J.L.; PEREZ, M.; CARVAJAL, A.; BANDRES, F.; LUCIA, A.
The salivary amylase, lactate and electromyographic response to exercise.
Jpn J Physiol. v. 49, nº6, p. 551-554, Dec, 1999.
29. CHICHARRO, J.L.; SERRANO, V.; URENA, R.; GUTIERREZ, A.M.;
CARVAJAL, A.; FERNANDEZ-HERNANDO, P.; LUCIA, A. Trace elements
and electrolytes in human resting mixed saliva after exercise. **Br J Sports
Med.** v. 33, nº3, p. 204-207, Jun, 1999.
30. CHICHARRO, J.L.; LUCIA, A.; PÉREZ, M.; VAQUERO, A.F.; Urena, R.
Saliva composition and exercise. **Sports Méd.** v.26, p. 17-27, 1998.
31. CHICHARRO, J. L.; LEGIDO, J.C.; ALVARES J.; SERRATOSA, L.;
BANDRES, F.; GAMELAa, C. Saliva electrolytes as a useful tool for
anaerobic threshold determination. **Kur- J.Appl Phys.** v. 68, p. 214-218,
Dec, 1994.
32. CHWALBINSKA-MONETA, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; KRYSZTOFIK,
H.; ZIEMBA, A.; KRZEMINSKI, K.; KRUK, B.; NAZAR, K. Relationship
between EMG blood lactate, and plasma catecholamine thresholds during
graded exercise in men. **J Physiol Pharmacol.** v. 49, nº3, p. 433-41, Sep,
1998.
33. CONNETT, R.J.; GAYESKI, T.E.J.; HONING, C.R. Energy sources in fully
aerobic rest-work transitions: a new role for glycolysis. **Am. J. Physiol.** p.
H922-H29, 1985.
34. CONNETT, R.J.; GAYESKI, T.E.J.; HONING, C.R. Lactate accumulation
in fully aerobic, working dog gracilis muscle. **Am J Physiol.** v. 246, p. h120-
128, 1984.
35. COOK, N.J., Ng, A.; READ, F.F.; et al. Salivary cortisol for monitoring
adrenal activity during marathon runs **Horm Res.** v. 25, p. 18-25, 1987.

36. COYLE, E.F.; HAGBERG, J.M.; HURLEY, B.F.; MARTIN, W.H.; EHSANI, A.A.; HOLLOSZY, J.O. Carbohydrate feeding during prolonged strenuous exercise can delay fatigue. **J Appl Physiol.** v. 55(1 Pt 1), p.230-5, Jul, 1983.
37. DAVIS, J.A. et al., Anaerobic threshold and maximal aerobic power for three modes of exercise. **J Appl Physiol.** v. 41, p. 544-550, 1976.
38. DAWES, C. The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. **J Physiol.** v. 320, p. 139-48, Nov, 1981.
39. DAWES, C. Rhythms in salivary flow rate and composition. **Int J Chronobiol.** v. 2, p. 253-279, 1974.
40. DENNISS, A.R.; SCHNEYER, L.H.; SUCANTHAPREE, C.; YOUNG, J.A. Actions of adrenergic agonists on isolated excretory ducts of submandibular glands. **Am J Physiol.** v. 235, n° 6, p. 548-56, Dec, 1978.
41. DEVLIN, T.M. Textbook of Biochemistry, Wiley-Liss ed. 4^a ed, 1997.
42. DEVRIES, H.A.; MORITANI, T.; NAGATA, A.; MAGNUSSEN, K. The relation between critical power and neuromuscular fatigue as estimated from electromyographic data. **Ergonomics.** v. 25, n°9, p. 783-91 Sep, 1982.
43. DEVRIES, H.A.; TICHY, M.W.; HOUSH, T.J.; SMYTH, K.D.; TICHY, A.M.; HOUSH, D.J. A method for estimating physical working capacity at the fatigue threshold (PWCFT). **Ergonomics.** v. 30, n°8, p. 1195-204, Aug, 1987.
44. EDWARDS, R.G.; LIPPOLD, O.C. The relation between force and integrated electrical activity in fatigued muscle. **J Physiol.** v. 132, n°3, p. 677-81, Jun, 1956.
45. EKSTROM, J.; ASZTELY, A.; TOBIN, G. Non-adrenergic, non-cholinergic influences on parotid acinar degranulation in response to stimulation of the parasympathetic innervation in the anaesthetized rat. **Exp Physiol.** v. 81, n°6. p. 935-42, Nov, 1996.

46. ENBERG, N.; ALHO, H.; LOIMARANTA, V.; LENANDER-LUMIKARI, M. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 92, n°3, p. 292-8, Sep, 2001.
47. ENOKA, R.M.; STUART, D.G. Neurobiology of muscle fatigue. **J.Appl.Physiol.** v.72, n°5, p. 1631-1648,1992.
48. FARRELL, P.A.; WILMORE, J.H.; COYLE, E.F.; BILLING, J.E.; COSTILL, D.L. Plasma lactate accumulation and distance running performance. **Med Sci Sports.** v. 11, n°4, p. 338-44, 1979.
49. FITTS, R.H. Mechanisms of muscular fatigue. In Principles of Exercise biochemistry, 3rd edn, ed. Poortmans Jr. pp. 279-300. Kager, Basel. 2003.
50. FORTNEY, S. M., NADEL, E.R., WENGER, C.B., et al. Effect of blood volume on sweating rate and body fluids in exercising humans. **J Appl Physiol.** v. 51, p. 1594- 1600, 1982.
51. GAESSER, G.A, WARD, S.A., BAUM, V.C., WHIPP, B.J. Effects of infused epinephrine on slow phase O₂ uptake kinetics during heavy exercise in humans. **J. Appl. Physiol.** v. 77, p. 2413-2419, 1994.
52. GARRET, J.R.; KIDD, A. Effects of autonomic nerve stimulation on submandibular acini and saliva in cats [proceedings]. **J Physiol.** v. 263, n°1, p. 198P-199P, Dec, 1976.
53. GARRET, J.R., EMMELILN, N. Activities of salivary myoepithelial cells: **A Review, Med Biol.** v. 57, p. 1-28, 1979.
54. GLEESON, M.; CRIPPS, A.W.; CLANCY, R.L. Modifiers of the human mucosal immune system. **Immunol Cell Biol.** v. 73, n°5, p. 397-404, Oct, 1995.
55. GLEESON, M.; MCDONALD, W.A.; PYNE, D.B.; CLANCY, R.L.; CRIPPS, A.W.; FRANCIS, J.L.; FRICKER, P.A. Immune status and respiratory illness

for elite swimmers during a 12-week training cycle. **Int J Sports Med.** v. 21, n°4, p.302-7, May, 2000.

56. GLEIN, G.W. ZABETAKIS, P.M.; DEPONQUALE, E.E.; MICHELIS, M.F.; NICOLAS, J.A. Plasma osmolarity, volume and rennin activity at the "anaerobic threshold". **J Appl Physiol.** v. 52,p. 991-994, 1984.
57. GREEN, H.J.; HUGHSON, R.L.; ORR, G.W.; RANNEY, D.A. Anaerobic threshold, blood lactate, and muscle metabolites in progressive exercise. **J Appl Physiol.** v. 54, n°4, p. 1032-8, Oct, 1983.
58. HAGBERG, J.M.; COYLE, E.F.; CARROLL, J.E.; MILLER, J.M.; MARTIN, W.H.; BROOKE, M.H. Exercise hyperventilation in patients with McArdles disease. **J. Appl. Physiol.** v. 52, p. 991-994, 1982.
59. HAMON, C.B.; KLEBANOFF, S.J.A. Peroxidase mediated Streptococcus mitis - dependent Antimicrobial System in Saliva, **J Exp Med.** v. 137, p. 438-450, 1973.
60. HANON, C.; THEPAUT-MARTHIEU, C.; HAUSSWIRTH, C.; LE CHEVALIER, J.M. Electromyogram as an indicator of neuromuscular fatigue during incremental exercise. **Eur J Appl Physiol.** v. 78, p. 315-323, 1998.
61. HARGREAVES, J.A. Discussion: diet and nutrition in dental health and disease **Am J Clin Nutr.** v. 61, n°2, p. 447S-448S, Feb, 1995.
62. HAY, D.L., The isolation from Human Parotid Saliva of a Tyrosine-rich Acidic Peptide which Exhibits High Affinity for Hydroxyapatite Surfaces, **Arch Oral Biol.** v.18, p. 1531-1541, 1973.
63. HAY, D.I. Fractionation of Human Parotid Salivary Proteins and the Isolation of an Histidine-rich Acidic Peptide Which show high Affinity for Hydroxyapatite Surfaces, **Arch Oral Biol.** v. 20, p. 553-558, 1975.
64. HAY, D.I.; GRØN, P. Inhibitors of Calcium Phosphate Precipitation in human Whole Saliva. In: **Proceeding, Microbia Aspects of Dental Caries,**

- H. M. Stiles, Wl J. Loesche, W. J. Loesche, T. C, O' Brien, Eds., Sp. Supp. Microbiol Abst 1976; pp. 143-150., Washington: Information Retrieval,
65. HECK, H.; MADER E HECK, A.; HESS, G.; MUCKE, S.; MULLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. **Int J Sports Med.** v. 6, n°3, p.117-30, Jun, 1985.
 66. HOFMAN, L.F. Human saliva as a diagnostic specimen. **J Nutr.** v. 131, n°5, p. 1621S-5S, May, 2001.
 67. HOLBROOK, I.B.; MOLAN, P.C. The identification of a peptide in human parotid saliva particularly active in enhancing the glycolytic activity of the salivary micro-organisms. **Biochem J.** v.149, n°2, p.489-92, Aug, 1975.
 68. HOLLMANN, W. Historical remarks on the development of the aerobic-anaerobic threshold up to 1966. **Int J Sports Med.** v. 6, n°3, p.109-16, Jun, 1985 .
 69. HUG, F.; LAPLAUD, D.; SAVIN, B.; GRELOT, L. Occurrence of electromyographic and ventilatory thresholds in professional road cyclists. **Eur J Appl Physiol.** v. 90, n° 5-6, p. 643-6, Nov, 2003.
 70. HUGHES, R.L.; CLODE, M.; EDWARDS, R.H.T.; et al. Effect of inspired O₂ on cardiopulmonary and metabolic exercise responses in man. **J Appl Physiol.** v. 24, p. 336-347, 1968.
 71. HULTMAN, E.; SAHLIN, K. Acid-base balance during exercise. **Exercise Sport Science Rev**, 1980; 8:41-128. Lenander-Lumikari, M.; Ihalin, R.; Laehteenoja, H. Changes in whole saliva in patients with celiac disease. **Arch Oral Biol.** Turku, Finland, v.26, p.165–173. 2001.
 72. ISSEKUTZ, B. Jr. Effect of β -adrenergic blockade on lactate turnover in exercising dogs. **J. Appl. Physiol.** v. 57, p. 1754-1759, 1984.
 73. IWAMOTO, Y.; INQUE, m., TSUNEMITSU, A, MATSUMURA T. Some Properties of the Salivary Antibacterial Factors (SA Factor), **Arch Oral Biol.** v. 12, p. 1009-1012, 1967.

74. IWAMOTO, Y.; MATSUMURA, T. Purification and Characterization of the Salivary Antibacterial Factor (AS Factor), **Arch Oral Biol.** v. 12, p. 667-676, 1966.
75. JANSSON, E.; HJEMDAHL, P.; KAUSER, L. Epinephrine induced changes in muscle carbohydrate metabolism during exercise in male subjects. **J. Appl. Physiol.** v. 60, p. 1466-1470, 1986.
76. JENZANO, J.W.; HOGAN, S.L.; NOYES, C.M.; FEATHERSTONE, G.L.; LUNDBLAD, R.L. Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. *Anal Biochem.* v. 159,nº2, p.370-6, 1986.
77. JOHNSON, D.A.; ETZEL, K.R.; ALVARES, O.F.; CORTEZ, J.E. Regulation of parotid salivary proteins by glucocorticoids. **J Dent Res.** v. 66, nº10, p. 1563-8, Oct, 1987.
78. KATZ, A.; SAHLILN, K. Role of oxygen in regulation of glycolysis and lactate production in human skeletal muscle. In: **Pandeolf KBHJ.** Ed. Exercise and sport sciences reviews. Baltimore: Williams e Wilkins. 1990; 1-28.
79. KAUFFMAN, D.L.; ZAGER, N.I.; COHEN, E.; KELLER, P.J. The isoenzymes of human parotid amylase. *Arch Biochem Biophys.* v.37, nº2, p.325-39, 1970.
80. KINDERMAN, E.; SCHANABEL, A.; SCHMITT, W. M., et al. Catecholamines, growth hormone, cortisol, insulin, and sex hormones in anaerobic and aerobic exercise. **Eur J Appl Physiol.** v. 49, p. 389-399, 1982.
81. KINDERMANN, W.; SOMON. and KEUL,. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensives during endurance training. **Eur.J.Appl.Physiol.** v. 42, p. 25-34,1979.

82. LEHMANN, M.; SXHINID, P.; KEUL, J. Plasma catecholamines and blood lactate accumulation during incremental exhaustive exercise. **Int. Journal of Sports Méd.** v. 6, p. 78-81, 1985.
83. LENANDER-LUMIKARI, M.; IHALIN, R.; LAHTEENOJA, H. Changes in whole saliva in patients with coeliac disease. **Arch Oral Biol.** v. 45, nº5, p. 347-54, May, 2000.
84. LJUNGBERG, G.; ERICSON, T.; EKBLOM, B.; BIRKHED, D. Saliva and marathon running. **Scand J Med Sci Sports.** v.7, nº4, p. 214-219, Aug, 1997.
85. LOPEZ J, ULIBARRENA C, GONZALEZ-PORQUE P, NAVAS G, ROLDAN E, CANCELAS JA, PEREZ-OTYZA J, BURGALETA C, GARCIA-LARANA J, SASTRE JL, et al. Amylase-producing Bence Jones multiple myeloma with pancreatitis-like symptoms. **Acta Haematol.** v. 90, nº 2, p. 99-101, 1993.
86. LÓPEZ RODRIGUEZ, C.; MARIN, B.; SANZ, P. Comparative hormonal, anthropometric and bodily study of 'leonese' wrestlers. **Med Sport.** v. 48, p. 5-14, 1995.
87. LUCIA, A.; SANCHES, O.; CARVAJAL, A.; CHICHARRO, J.L. Analysis of the aerobic-anaerobic transition in elite cyclists during incremental exercise with the use of electromyography. **Br J Sports Méd.** v. 33, nº3, p. 178-85, Jun, 1999.
88. LUCIA, A.; VAQUERO, A.F.; PEREZ, M.; SANCHEZ, O.; SANCHEZ, V.; GOMEZ, M.A.; CHICHARRO, J.L. Electromyographic response to exercise in cardiac transplant patients: a new method for anaerobic threshold determination? **Chest.** v. 111, nº6, p. 1571-6, Jun, 1997.
89. MACRAE, H.S.; DENNIS, S.C.; BOSCH, A.N.; NOAKES, T.D. Effects of training on lactate production and removal during progressive exercise in humans. **J Appl Physiol.** v.73, nº5, p. 2205-7, 1992.

90. MACKAY, B. J., Pollock, J. J., IACONO, V. J., BAUM, B. J. Isolation of Milligram Quantities of a Group of Histidine-rich Polypeptides from human Parotid Saliva, **Infect Immun.** v. 44, p. 688-694, 1984.
91. MACKINNON, L.T.; CHICK, T.W.; VAN As A, et al. Decreases secretory immunoglobulins following intense endurance exercise. **Sports Train Med Rehab.** v. 1, p. 209-218, 1989.
92. MACKINNON, L.T.; HOOPER, S. Mucosal (secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during over training. **Int J Sports Med.** v. 15, p. S179-193, 1994.
93. MACKINNON, L.T.; GINN, E.; SEYMOUR, G.J. Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite Kayakers. **Eur J Appl Physiol.** v. 67, p. 180-4, 1993.
94. MACKINNON, L.T.; JENKINS, D.G. Decreased salivary immunoglobulins after intense interval exercise before and after training. **Med Sci Sports Exerc.** v. 25, nº6, p. 678-83, Jun, 1993.
95. MADER, A.; HECK, H. A theory of the metabolic origin of "anaerobic threshold". **Int J Sports Med.** v. 7, nº 1, p. 45-65, Jun, 1986.
96. MARTINEZ, J.R. Ion transport and water movement. **J dent Res.** v. 66 special issue: 638-647, 1987.
97. MARTINEZ-MADRIGAL, F.; MICHEAU, C. Histology of the major salivary glands. **Am J Surg Pathol.** v. 13, nº10, p. 879-99, Oct, 1989.
98. MAZZEO, R.S.; MARSHALL, P. Influence of plasma catecholamines on the lactate threshold during graded exercise. **J Appl Physiol.** v. 67, p. 1319-1322, 1989.
99. MCDOWELL, S.L.; HUGHES, R.A.; HUGHES, T.J.; et al. the effect of exercise training on salivary immunoglobulin A and cortisol responses to maximal exercise. **Int J Sports Med.** v. 13, p. 577-580, 1992.

- 100.MCDOWELL, S.L.; CHALOS, K.; HOUSE, T.J.; et al. The effect of exercise intensity and duration on salivary immunoglobulin A. **Eur J Appl Physiol.** v. 63, p. 108-111, 1991.
- 101.MINAGUCHI, K., BENNICK, Genetics of human salivary proteins. **J. Dent. Res.** v. 68, p. 2-15, 1989.
- 102.MORITANI, T.; DEVRIES, H.A. Reexamination of the relationship between the surface integrated electromyogram (IEMG) and force of isometric contraction. **Am J Phys Med.** v. 57, n°6, p. 263-77, Dec, 1978.
- 103.MORITANI, T.; DEVRIES, H.A. Potential for gross muscle hypertrophy in older men. **J Gerontol.** v. 35, n°5, p. 672-82, Sep, 1980.
- 104.MORITANI, T.; NAGATA, A.; DEVRIES, H.A.; MURO, M. Critical power as a measure of physical work capacity and anaerobic threshold. **Ergonomics.** v. 24, n°5, p. 339-50, May, 1981.
- 105.MORITANI, T.; NAGATA, A.; MURO, M. Electromyographic manifestations of muscular fatigue. **Med Sci Sports Exerc.** v. 14, n°3, p. 198-202,1982.
- 106.MYERS, J.; FROELICHER, V.F. Hemodynamic determinants of exercise capacity in chronic heart failure. **Ann Intern Med.** v. 115, p. 377- 386, 1991.
- 107.MYERS, J.; ASHLEY, E. Dangerous Curves: A perspective on exercise, lactate and the anaerobic threshold. **Chest.** v. 111, p. 787-795, 1997.
- 108.NAGATA, A.; NURO, M.; MORITANI, T.; YOSHIDA ,T . Anaerobic Threshold Determination by Blood Lactate and Myoelectric Signals. **Japanese Journal of Physiology.** v. 31, p. 585-597,1981.
- 109.NAUNTOFTE, B. Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. **Am J Physiol.** v. 263(6 Pt 1), p. G823-37, Dec, 1992.

- 110.NEDERFORS, T.; DAHLOF, C. Effects of the beta-adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human whole saliva flow rate and composition. **Arch Oral Biol.** v. 37, nº7, p. 579-84, 1992.
- 111.OBMINSKI, Z.; STUPNICKI, R. Relations between cortisol in saliva, total and free cortisol and transcortin in serum. In: Gorog S, editor. **Advances in steroid analysis**, Budapest: Adademiai Kiado, 1990: 453-458.
- 112.OLIVEIRA, F.; GAGLIARD, J.F.L.; KISS, M.A.P.D. Proposta de referências para a prescrição de treinamento aeróbio e anaeróbio para corredores de média e longa duração. *Revista Paulista de Educação Física*, v.8, nº 2, p.68-76, 1994.
- 113.OLMEZ, I.; GULOVALI, M.C.; GORDON, G.E.; HENKIN, R.I. Trace elements in human parotid saliva.**Biol Trace Elem Res.** v. 17, p. 259-70, Sep-Dec, 1988.
- 114.OPPENHEIM, F.G.; YANG, Y.C.; DIAMOND, R.D.; HYSLOP, D.; OFFNER, G.D.;, TROXLER, R.F. The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. **Biol Chem.** v. 261, nº 3, p. 1177-82, Jan, 1986.
- 115.PETROFSKY JS. Frequency and amplitude analysis of the EMG during exercise on the bicycle ergometer. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.** v. 41, nº1, p. 1-15, Apr, 1979.
- 116.PILARDEAU, P.; RICHALET, J.P.; BOUISSOU, P.; VAYSSE, J.; LARMIGNAT, P.; BOOM, A. Saliva flow and composition in humans exposed to acute altitude hypoxia. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.** v. 59, nº 6, p. 450-3, 1990.
- 117.PODOLIN, K.A.; MUNGER, P.A.; MAZEEO, R.S; Plasma catecholamine and lactate response during graded exercise with varied glycogen conditions. **J Appl Physiol.** v. 71, p. 1427-1433, 1991.

- 118.PORT, K. Serum and saliva cortisol responses and blood lactate accumulation during incremental exercise testing. **Int J Sports Méd.** v. 12, p. 490-494, 1991.
- 119.PORTNEY, L. Eletromiografia e testes de velocidade de condução nervosa
IN: SULLIVAM, O.; SUSAN, B.; SHMITZ THOMAZ, J. Reabilitação física: avaliação e tratamento. 2. ed. São Paulo: Manole, Cap. 10, p. 183-223, 1993.
- 120.PRAKOBPHOL, A.; LEVINE, M.J.; TABAK, L.A.; Reddy, M.S. Purification of a Low-Molecular-Weight Mucin-Type Glycoprotein from Human submandibular Sublingual Saliva. **Carbohydrate Res.** v. 108, p. 111-122,1982.
- 121.PROCTOR, K.G.; DULING, B.R. Oxygen-derived free radicals and local control of striated muscle blood flow. **Microvasc Res.** v. 24, nº 1, p. 77-86, Jul, 1982.
- 122.PROCTOR, V.A.; CCNNINGHAM, F.E. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 26, nº4, p. 359-95, 1988.
- 123.RAMASUBBU K, SCHOENHAGEM P, BALGHITH MA, BRECHTKEN J, ZIABA KM, KAPADIA SR, HOBBS RE, RINCON G, NISSEN SE, TUZCU EM. Repeated intravascular ultrasound imaging in cardiac transplant recipients does not accelerate transplant coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol.** v. 41, nº 10, p. 1739-43, May, 2003.
- 124.RANTONEN, P.J.; MEURMAN, J.H. Correlations between total protein, lysozyme, immunoglobulins, amylase, and albumin in stimulated whole saliva during daytime. **Acta Odontol Scand.** v.58, nº4, p. 160-5, Aug, 2000.
- 125.RIBEIRO, J.P.; YANG, J.; ADAMS, R.P.; KUCA, B.; KNUTTEN, H.G. Effect of different incremental exercise protocols on the determination of lactate and ventilatory thresholds. **Braz J Med Biol Res.** v.19, nº1, p. 109-17, 1986.

- 126.SAHLIN, K. Metabolic factors in fatigue. **Sports Med.** v. 13, p. 99-107, 1992.
- 127.SALMINEN, S.; KONTINEN, A. Effect of exercise on Na and K concentrations in human saliva and serum. **J Appl Physiol.** Jul; 18:812-4, Jul, 1963.
- 128.SCHHEIDER, D. A.; MCGUIGGEN, M.E.; KAMIMORI, G,H. A comparison of the blood lactate and plasma catecholamines threshold in untrained male subjects. **Int J Sports Méd.** v. 13, p. 562-566, 1992.
- 129.SCHNEIDER, D.A.; MCLELLAN, M.T.; GASS. C.G. Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 32, nº3, p. 608-613, 2000.
- 130.SCHNEYER, C.A. Salivary gland changes after isoproterenol induced enlargement. **Am J Physiolog.** v. 203, p. 232-236, 1962.
- 131.SCHNEYER, L.H.; YONG, J.A.; SCHNEYER, C. A. Salivary secre5ion of electrolytes. **Physiology Ver.** v. 52, p. 720-777, 1972.
- 132.SCHRAGER, J.; OATES, M. D. G. The isolation and partial characterization of the principal glycoprotein from mixed saliva, **Arch Oral Biol.** v. 16, p. 287-303, 1971.
- 133.SCHUETZ, W.; TRAEGER, K.; ANHAEUPL, T.; SCHANDA, S.; RAGER, C.; VOGT, J.; GEORGIEFF, M. Adjustment of metabolism, catecholamines and beta-adrenoceptors to 90 min of cycle ergometry. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.** v. 70, nº1, p. 81-7, 1995.
- 134.SEGURA, R.; JAVIERRE, C.; VENTURA, J.L.; LIZARRAGA, M.A.; CAMPOS, B.; GARRIDO, E. A new approach to the assessment of anaerobic metabolism: measurement of lactate in saliva. **Br J Sports Med.** v. 30, nº4, p. 305-9, Dec, 1996.

- 135.SHOMERS, J.P.; TABAK, L.A.; LEVINE, M.J.; MANDE, I.D.; ELISSON, S.A. The isolation of a Family of Cysteine-containing Phosphoproteins from Submandibular-Sublingual Saliva, **J Dent Res.** v. 61, p. 973-977, 1982.
- 136.SICILIANO, G.; RENNA, M.; MANCA, L.; et al. The relationship of plasma catecholamine and lactate during anaerobic threshold exercise in mitochondrial myopathies. **Neuro muscul Disord.** v. 9, nº 6-7, p. 411-416, 1999.
- 137.SIHVONEN, T.; PARTANEN, J.; HANNINEN, O. Averaged (rms) surface EMG in testing back function. **Electromyogr Clin Neurophysiol.** v. 28, nº 6, p. 335-9, Aug-Oct, 1988.
- 138.SIMÕES, H.G.; CAPBELL, C.S.G.; BALDISSERA, V.; DENADAI, B.S.; KOKUBUN, E. Determinação do limiar anaeróbico por meio de dosagens glicêmicas e lactacidêmicas em teste de pista para corredores. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v.12, p.17-30, Jan-Jun, 1998.
- 139.SISKIND, S.J.; SONNENBLICK, E.H.; FORMAN, R.; SCHEUER, J.; LEJEMTEL, T.H. Acute substantial benefit of inotropic therapy with amrinone on exercise hemodynamics and metabolism in severe congestive heart failure. **Circulation.** v. 64, nº 5, p. 966-73, Nov, 1981.
- 140.SJOSTROM, L.; SCHUTZ, Y.; GUDINCHET, F.; HEGNELL, L.; PITTET, P.G.; JEQUIER, E. Epinephrine sensitivity either respect to metabolic rate and other variable in women. **Am J. Physiol.** v. 245 (Endocrinol. Metab. 8) p. E431-E442, 1983.
- 141.SLOWEY, R.R.; EIDELLMAN, S.; KLEBANOFF, S.J. Antibacterial Activity of the Purified Peroxidase from Human Parotid Saliva. **J Bact.** v. 96, p. 575-579, 1968.
- 142.SPEIRS, R.L.; HERRING, J.; COOPER, W.D.; HARDY, C.C.; HIND, C.R. The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland. **Arch Oral Biol.** v. 19, nº 9, p. 747-52, Sep, 1974.

143. STAINSBY, W.N.; BROOKS, G.A. Control of lactate metabolism in contracting muscles and during exercise. **Exercise and Sports Sciences Reviews**, Williams e Wilkins, Baltimore, 1990.
144. STATEN, M.A.; MATTHEWS, D.E.; CRUER, BIER, D. M. Physiological increments in epinephrine stimulates metabolic rate in humans. **Am. J. Physiol.** v. 253 (Endocrinol. Metab. 16) p. E322-E330, 1987.
145. STEERENBERG, P.A; VAN ASPEREN, I.A; VAN NIEUW AMERONGEN, A; BIEWENGA, A.; MOL, D.; MEDEMA, G.J.; Salivary levels of immol/Lunoglobulin A in triathletes. **Eur J Oral Sci.** v. 105, nº 4, p. 305-9, Aug 1997.
146. STUPNICKI, R.; OBMINSKI, Z. Glucocorticoid response to exercise as measured by serum and salivary cortisol. **Eur J Appl Physiol.** v. 65, p. 546-549, 1992.
147. SUDDICH, R.P.; DOWD, F.J. Mechanism of salivary secretion. In: Manaker, L. **The biologics basis of dental caries: an oral biology textbook of lewis**. Manarker. Hagerstow (MD): Haper e Row Publishers, p.67-118, 1986.
148. TAKAISHI T; ONO T, YASUDA Y. Relationship between muscle fatigue and oxygen uptake during cycle ergometer exercise with different ramp slope increments. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.** v.65, nº4, p. 335-9, 1992.
149. TENOVUO, J. Different Molecular Forms of Human Saliva Lactoperoxidase. **Arch Oral Biol.** v. 26, p. 1051-1055, 1981.
150. THARP, G.F.; BARNES, M., Reduction of saliva immunoglobulin levels by swim training. **Eur J Appl Physiol.** v. 60, p. 61-64, 1990.
151. THAYSEN, J.H.; THORN, N.A.; SCHAWARTZ, I.L. Excretion of sodium, potassium chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. **Am.J. Physiol.** v. 178, p. 155-159, 1954.

- 152.VANHELDER, W.P.; RADOMSKI, M.W.; GOODE, R.C.; et al. Hormonal and metabolic response to three types of exercise of equal duration and external work output. **Eur J Appl Physiol**. v. 54, p. 337-342, 1985.
- 153.VIITASALO, J.H.; KOMI, P.V. Signal characteristics of EMG during fatigue. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**. v. 37, nº 2, p. 111-21, Sep, 1977.
- 154.VIITASALO, J.T., LUHTANEN, P.; RAHKILA, P. et al. Electromyographic activity related to aerobic and anaerobic threshold in ergometer bicycling. **Acta Physiol Scand**. v. 124, p. 287-293,1985.
- 155.VILLIGER, B.; EGGER, K.; LERCH, R.; Probst, H.; SCHNEIDER, W.; SPRING, H; TRITSCHLER,T. Resistência. Livraria Santos ed.ltda. 1^a ed. 1995.
- 156.VINING, R.F., MCGINLEY, R.A., MAKSUJTIS, J.J., et al. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. **Ann Clin Biochem**. v. 20, p. 329, 1983.
- 157.VISSING, J.; GALBO, H.; HALLER, R.G. Exercise fuel mobilization in mitochondrial myopathy: a metabolic dilemma. **Ann Neuro**. v. 40, p. 655-662, 1996.
- 158.WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; CLARK, A.M.; COOK, L.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. **J Sports Sci**. v. 17, nº 2, p. 129-134, Feb, 1999.
- 159.WASSERMAN K. The anaerobic threshold measurement in exercise testing. **Clin Chest Med**. v. 5, nº 1, p. 77-88, Mar, 1984.
- 160.WASSERMAN, K.; HANSEN, J.E.; SUE, D.Y.; WHIPP, B.J. Principles of exercise testing and interpretation. **Lea e Febiger**, Philadelphia, 1986.
- 161.WASSERMAN, K.; WHIPP, B.J.; KOYAL, S.N.; Beaver, W. L. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. **J Appl Physiol**. v. 35, p. 236-243, 1973.

162. WASSERMAN, K.; MCLLORY, M.B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **American Journal Cardiology**. v. 14, p. 844-852, 1964.
163. WESTERBLAD, H.; ALLEN, D.G.; LANNERGREN, J. Muscle fatigue: Lactic acid or inorganic phosphate the major cause? **News Physiol Sci**. v. 17, p. 17-21, 2002.
164. WASSERMAN, K.; BEAVER, W. L.; WHIPP, B.J. Gas exchange and lactic acid acidosis (anaerobic) threshold. **Circulation**. v. 81, p. 14-30, 1990.
165. WELTMAN, S.; WOOD, C.M.; WOMACK, C.J.; et al. Catecholamine and blood lactate responses to incremental rowing and running exercise. **J. Appl. Physiol**. v. 76, p. 1144-1149, 1994.
166. YOSHIDA, T.; UDO, M.; CHIDA, M.; et al. Effect of hypoxia on arterial and venous blood level of oxygen, carbon dioxide, hydrogen ions and lactate during incremental forearm exercise. **Eur J Appl Physiol**. v. 58, p. 772-777, 1989.

6. Capítulo Único

BIOMARCADORES SALIVARES, METABÓLICOS E NEUROMUSCULARES
COMO DETERMINANTES DO LIMAR ANAERÓBIO.

(Escrito conforme as normas da revista European Journal of Applied Physiology –
Anexo V)

6.1 Título: *Blood lactate, saliva total protein and alpha-amylase, electromyography as parameters to evaluate anaerobic threshold during physical stress.*

Autores: Vanessa N. Oliveira¹; Romeu P.M.S. Lamounier¹; Marcos Gonçalves de Santana²; Marco Túlio de Mello²; Heyder Diniz Silva³; Gilmar da Cunha Sousa⁴; Foued S. Espindola¹✉.

Afiliação: ¹Instituto de Genética e Bioquímica – Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Uberlândia – Campus Umuarama –Uberlândia, Minas Gerais; ²Escola Paulista de Medicina – Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo.³Faculdade de Matemática da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica – Uberlândia, Minas Gerais; ⁴Instituto de Ciências Biológicas - Laboratório de Eletromiografia, Universidade Federal de Uberlândia – Campus Umuarama- Uberlândia, Minas Gerais -

Autor correspondente: foued@ufu.br; Telefone: (55)34-3218-2477(Brazil), Fax: (55)34-3218-2203 (Brazil).

Vanessa Neves de Oliveira: Av: Prof. Ciro de Castro de Almeida 1905, apt 52 bloco-E Uberlândia MG-Brasil, CEP 38405-250

Romeu Paulo Martins Silva Lamounier: Rua José Antônio de Oliveira 35, Ap-23 bloco-C; Bairro: Ozanan; Uberlândia – MG-Brasil, CEP 38400-000.

Marcos Gonçalves de Santana: Rua Marselhesa 535, Vila Clementino, São Paulo-SP-Brasil, CEP 04020-060.

Marco Túlio de Mello: Rua Marselhesa 535, Vila Clementino, São Paulo-SP-Brasil, CEP 04020-060.

Foued Salmen Espindola: Rua Padre Anchieta 39, Centro- Uberlândia – MG-Brasil, CEP 38400-061.

Heyder Diniz Silva: Rua José Resende Costa 471, Av. Santa Maria - Uberlândia – MG- Brasil, CEP 38400-061.

Gilmar da Cunha e Sousa: Av: Prof. Ciro de Castro de Almeida 1905, apt 42 bloco-E
Uberlândia MG-Brasil, CEP 38405-250.

6.2 Abstract

This study investigates the influence of exercise on blood lactate and saliva (total protein concentration and alpha amylase activity) and neuromuscular biomarkers. We correlated these parameters with the anaerobic threshold (AT). Thirteen cyclists with mean age 22.6 ± 5.76 y; height 1.78 ± 0.2 cm; and weight 71.8 ± 5.76 kg performed a maximum incremental exercise on a cycle ergometer each stage for 2 min. At the end of each established period and in the fifth and fifteen min after the test, we collected blood and saliva samples to capture the exercise signs from the vastus lateralis and medialis muscles from both the legs of volunteers. It was measured the blood lactate total protein concentration, the protein alpha activity, and the electrophoretic profile. AT was determined by the bisegmented linear regression method. The anaerobic lactate threshold (ALT) were highly correlated with the total protein threshold (TPT) ($r=0.90$ and $p > 0.05$) and with the electromyographic threshold of the right vastus lateralis muscle (EMG_{ATRVL}) ($r=0.83$ and $p > 0.05$). The analysis of lactate and total protein concentration, and the alpha amylase activity showed significant differences from rest to the last stage of exercise ($p > 0.05$). The total salivary protein concentration and the electric activity of the right vastus lateralis muscle are good AT predictors. In addition, both the alpha amylase activity and the total salivary protein concentration are influenced by stress before, during, and after exercise.

Keywords: saliva, electromyography, anaerobic threshold, SDS-PAGE, amylase.

6.3 Resumo

O limiar anaeróbio de lactato e sua relação com as proteínas salivares e atividade eletromiográfica foi investigado sob condições de estresse físico. Doze ciclistas ($22,6 \pm 3,5$ anos; $1,78 \pm 0,2$ cm de altura; $71,8 \pm 5,76$ kg) foram submetidos ao teste de esforço progressivo em cicloergômetro. Durante o teste foram coletadas amostras de sangue e saliva, e captado os sinais elétricos dos músculos vasto lateral e vasto medial de ambas as pernas. Mensurou-se o lactato sanguíneo, concentração de proteína total e seu perfil eletroforético, as atividade da alfa-amilase salivar e elétrica do músculo. Os limiares anaeróbios de lactato foram altamente correlacionáveis com os limiares de proteína total e com os limiares eletromiográficos do músculo vasto lateral direito. O perfil de proteínas não alterou com o exercício, com exceção do polipeptídio correspondente a alfa-amilase salivar que mostrou um aumento de sua concentração durante o mesmo. Observou-se a ocorrência de um limiar quando os resultados densitométricos da banda da alfa-amilase foram plotados em relação à carga de trabalho. Os resultados mostraram que o estresse induzido pelo exercício é capaz alterar a concentração do lactato, proteína total e a atividade da alfa-amilase salivar durante e após o exercício. Esses dados sugerem que as concentrações de proteína total salivar e a concentração da alfa-amilase salivar são bons preditores do LA assim como indicadores de estresse físico.

Palavras chave: saliva, eletromiografia, limiar anaeróbio, estresse físico, amilase.

6.4 Introdução

O exercício induz o aumento no recrutamento de unidades motoras e alterações bioquímicas nos sistemas corporais que modificam a composição de alguns componentes do sangue e saliva, entre outros fluidos corpóreos. Essas alterações podem ser usadas como indicadores da resposta fisiológica dos vários sistemas (Streckfus and Bigler 2002). A análise de componentes salivares, tais como eletrólitos, proteína total e atividade da α -amilase para detectar o limiar salivar (LA_{sa}), e atividade elétrica do músculo para detectar o limiar eletromiográfico (EMG_{lan}) podem representar uma alternativa não invasiva na determinação da intensidade de exercício correspondente ao limiar anaeróbio (Calvo et al. 1997, Bishop et al. 2000, Walsh et al. 2003, Hug et al. 2003).

As alterações ocorridas na concentração da alfa-amilase salivar durante exercício foram usadas como parâmetros para predizer o limiar anaeróbio (LA) (Calvo et al. 1997). O limiar salivar e de lactato apresentaram alta correlação quando expressos em relação à velocidade de corrida. No mesmo aspecto, as alterações das concentrações de eletrólitos na saliva durante exercício físico em cicloergômetro e o limiar anaeróbio de lactato (LAL) indicaram que os níveis de Na^+ e Cl^- são altamente correlacionados com o LAL (Chicharro et al. 1998). Desse modo, a saliva apresenta biomarcadores que podem indicar alterações decorrentes do exercício físico, sendo equivalentes com a determinação do limiar do lactato sanguíneo.

A amilase é a proteína mais abundante na saliva, correspondendo de 10-20 % do conteúdo protéico produzido pelas glândulas salivares e é principalmente sintetizada pela glândula parótida (Speirs et al. 1974; Turner and Sugiyama 2002; Nater et al. 2005). A análise eletroforética das proteínas da saliva da parótida de ratos (Chatterton et al. 1996) revelou que o conteúdo de proteínas presentes na glândula parótida é marcadamente influenciado pelo tipo de estimulação (simpática ou parassimpática) usada para evocar a secreção. O sistema nervoso simpático tem sua atividade aumentada progressivamente com a intensidade do exercício (Stainsby e Brooks 1990), sendo o principal responsável pelas alterações causadas nos componentes salivares no decorrer do mesmo (Walsh et al. 2003; Chicharro et al. 1998; Bishop et al. 2000). Existem evidências que a

atividade da alfa-amilase salivar também aumenta em resposta ao exercício em esteira (Gilman et al. 1979a), exposição a altas temperaturas (Gilman et al. 1979b), corrida (Nexo et al. 1988, Steerenberg et al. 1997) exposição ao frio (Chatterton et al. 1996) e ciclismo (Chatterton et al. 1996, Walsh et al. 1999). Além da atividade da alfa-amilase ser um possível indicador de estresse físico, a medida de sua atividade também poderia ser um excelente indicador de estresse psicológico, uma vez que sua secreção é regulada pelo sistema nervoso simpático adrenomédular, através da ação da norepinefrina sobre as glândulas salivares (Chatterton et al. 1996; Nater et al. 2005; Yamaguchi et al. 2004). Sob condições de estresse, a atividade da alfa-amilase aumenta mais rápido que as concentrações de cortisol e após a retirada do fator estressante sua atividade também diminui mais rapidamente, além disso, deve-se levar em consideração que o uso da saliva representa uma forma não invasiva de se avaliar o estresse e de biosegurança Classe I (Shirtcliff et al. 2001; Steger et al. 2005; Nater et al. 2005;).

A contração muscular em certa tensão submáxima causa mudanças fisiológicas no sistema neuromuscular, os quais se manifestam pelo aumento da contribuição neural para o músculo. A quantidade desse impulso neural é freqüentemente medido pela eletromiografia integrada (EMGi) (Edwards e Lippold 1956; Viitasalo e Komi 1977; Petrofsky 1979; Moritani et al. 1982). O aumento abrupto no sinal coletado pela EMGi, representando mudanças no recrutamento de unidades motoras (UM) e/ou na freqüência de disparo de UM durante exercício progressivo, correlaciona significativamente com a captação de oxigênio (VO_2) no limiar anaeróbio (Moritani 1982). A maior intensidade de exercício que pode ser mantida sem que haja um aumento no sinal da EMGi foi definida como “limiar de fadiga” (Moritani et al. 1993), e posteriormente conceituado por outros autores como “limiar eletromiográfico” (EMGlan) (Hanon et al. 1998; Lucia et al. 1999).

No presente estudo, analisou-se as alterações ocorridas na concentração da proteína total salivar, assim como na atividade da alfa-amilase salivar durante exercício com incremento de carga. Além disso, averiguou-se a existência do limiar de proteína total, amilase salivar e eletromiográfico e sua correlação com o limiar anaeróbio individual de lactato. Observou-se também o perfil das proteínas da saliva e quantificou o polipeptídeo correspondente a alfa-amilase. Ao mesmo

tempo, investigou-se a ocorrência de diferenças significativas na concentração de proteína, atividade da amilase e lactato sanguíneo decorrentes no repouso, exaustão e 15 minutos após o término do exercício.

6.5 Métodos

6.5.1 Voluntários

Doze ciclistas, entre professores de spinning (8) e triatletas (4) participaram do estudo. A média ($\pm$ DP) da idade, altura e peso dos voluntários foram: $22,6 \pm 3,5$ anos, $1,78 \pm 0,2$ cm, $71,8 \pm 5,76$ kg respectivamente. Exame de sangue prévio [incluindo hemograma total e análise bioquímica (creatinina, sódio, potássio, HDL-colesterol, triacilglicerol)] serviu como parâmetro para avaliar os voluntários que não apresentavam bom estado de saúde para realizar o teste, evitando possíveis interferências na análise das amostras. Nenhum deles fazia uso de fármacos, esteróides anabólicos ou tabaco.

No dia anterior ao teste os voluntários não fizeram nenhum tipo de esforço físico e sua última refeição foi feita pelo menos duas horas antes do teste. Além disso, foram orientados a fazerem uma higienização completa da boca e que ingerissem bastante água na véspera do teste de esforço (aproximadamente 24h). Nenhuma substância estimulante (café, guaraná, etc.), ou contendo corantes puderam ser ingeridas.

Os voluntários aptos, cientes e interessados em participar do projeto assinaram um termo de consentimento, estando avisados de todos os procedimentos a serem tomados e executados antes, durante e após os testes. O protocolo experimental só teve início após ter sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Universidade Federal de Uberlândia (parecer nº. 140/04).

6.5.2 Teste de esforço com incremento de carga em cicloergômetro.

Os testes foram realizados em cicloergômetro (Ergofit 167, Germany) entre as 9:00 e 11:00 horas da manhã com a temperatura da sala mantida entre 24 e 26°C. Os voluntários realizaram alongamento e um breve aquecimento de dois minutos sem carga. A frequência cardíaca foi mensurada durante todo o tempo por um monitor de frequência cardíaca (Polar S610TM, Polar Electro Oy,

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

6.5.3 Coleta da saliva e mensuração da proteína total e atividade da α -amilase

A saliva, estimulada por goma de mascar (trident-menta®), foi coletada pelo método de cuspe, segundo Navazesh (1993). Logo antes da coleta os voluntários enxaguaram a boca várias vezes com água destilada, para limpeza de “debris” celulares e outros. A coleta da saliva iniciava 30 segundos antes de terminar o estágio. A saliva era colocada em mini-tubos pré-resfriados (4°C) e mantida no gelo até a centrifugação à 12.000 g (4° C). O sedimento era descartado e o sobrenadante congelado a -20°C até a data da análise. A proteína total foi mensurada pelo método de Bradford (1976) e a atividade da amilase salivar foi realizada por método cinético a 405 nm, utilizando o substrato 2 cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriosídeo (CNP-G3), conforme o protocolo do fabricante (Amilasa 405, linha líquida, Wiener lab, Argentina).

6.5.4 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida foi realizada como descrito por Laemmli e Favre (1973). Foram utilizados mini-géis com gradiente de 5 a 22% de poliacrilamida. As amostras foram preparadas pela adição de 10% (v/v) do volume de tampão desnaturante [10X] (Tris – HCl 31,2 mM pH..., SDS 8,75%, sacarose 20%, β -mercaptoetanol 10%, EGTA-K 11mM e bromophenol blue 0,25%) e pela fervura em banho maria por 2 minuto. Alíquotas das amostras contendo 3 μ g de proteínas foram aplicadas em mini-géis (10 x 8 cm) e corridas a 35 mA em tampão eletrodo (Tris-HCl 25mM pH 8.3, EDTA 1,95mM, glicina 192mM, SDS 0,75%). Após a corrida, as amostras foram coradas com solução contendo Comassie Blue R250 0,25%, ácido acético 10% e metanol 50%. Os géis foram descorados em solução descorante (metanol 30% e ácido acético 9%) e guardados em solução de ácido acético 7%. O padrão de massa molecular

utilizado (SDS-6H, Sigma, St Louis, MO) contém cadeia pesada da miosina II de músculo de coelho (205 kDa), β -galactosidase de *E. coli* (116 kDa), fosforilase b de músculo de coelho (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa).

A identificação da banda com migração no gel correspondente à alfa-amilase salivar foi baseada na sua intensidade (Schwartz et al. 1995) e massa molecular relativa conhecida (46-60 kDa) de acordo com Schenkels et al. 1995. A quantificação da banda (spots) da alfa-amilase de cada estágio do exercício físico foi realizada pela análise densitométrica do gel através do programa Image Master VDS Software versão 2.0 e os resultados expressos em índice de densidade ótica (IOD).

6.5.5 Coleta e Análise do Sinal Eletromiográfico

Os sinais elétricos dos músculos foram obtidos através de um eletromiógrafo computadorizado contendo as seguintes características: aquisição simultânea de até oito canais diferenciais, terra comum a todos os canais, filtros com faixa de passagem de 20 Hz e 5 KHz, um estágio amplificador ajustável, possibilitando ganhos entre 100 vezes e 4960 vezes, isolamento galvânica (1,5 KV a 60 Hz) entre o circuito eletrônico e o estágio que fica em contato com o usuário, impedância de entrada dos canais de $10G\Omega$ em modo diferencial, amplificador de ganho programável de 1, 2, 4 e 8 vezes, Buffer FIFO com capacidade de 1024 amostras, 12 bits de resolução, taxa máxima de conversão de 330 KHz e faixa de entrada de $-10V$ a $+10V$.

Com a finalidade de diminuir a resistência elétrica, a pele foi previamente tricotomizada e limpa com álcool 70 %, como recomendado por Basmajian (1973). Os eletrodos foram fixados à pele com fita adesiva micropore (3M do Brasil).

Como referência para colocação dos eletrodos na região de pele sobre os músculos vasto medial (VM) e vasto lateral (VL) fez-se com caneta dermatográfica, uma linha da espinha ilíaca ântero-superior ao centro da patela.

Para a captação da atividade elétrica do músculo vasto medial, o eletrodo (Lyns Eletronics Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi posicionado a 4 cm da borda súpero-medial da patela (Hanten e Schulthies, 1990), com um ângulo de

inclinação de 50 a 55° em relação à linha traçada. Para o músculo vasto lateral o eletrodo foi colocado a 15 cm da borda súpero-lateral da patela, com ângulo de inclinação de 13,6° em relação à linha de referencia. Os eletrodos foram fixados paralelos aos músculos com as barras de detecção perpendiculares ao sentido das fibras musculares, como descrito por Andreassen e Rosenfalck (1978), Andriacchi et al. (1984) e De Luca (1997), e conectados aos canais do eletromiógrafo.

A atividade elétrica bilateral dos músculos VL e VM foram coletados em um tempo correspondente a 15 seg (aproximadamente 16 ciclos completos de pedalada) antes do término de cada estágio, a uma frequência de 2 kHz, e foi analisada utilizando o software Myosystem – Br1 (versão 2.5). Este transforma o potencial de ação dos músculos estudados em valores numéricos da Raiz Quadrada da Média (RMS – root mean square). Estes valores são expressos em microvolts (μV), e representam uma das informações mais precisas do sinal eletromiográfico (Basmajian e De Luca, 1985). Foi utilizado ainda um eletrodo de referência, Eletrodo Terra Placa (Bio-logic Systems Co.- SP Médica, Científica e Comercial Ltda., São Paulo, SP, Brasil), fixado na tuberosidade da tíbia, por ser considerado um ponto de referência ideal por estar próximo aos músculos examinados. O referido eletrodo foi untado com pasta gel eletrocondutora Eletron (Hal Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, SP, Brasil) para melhorar a condutibilidade entre a pele e o eletrodo, minimizando assim, eventuais interferências.

6.5.6 Coleta e análise do sangue

Utilizando-se de luvas cirúrgicas, e após assepsia local com álcool, foi feita punção do lobo da orelha por meio de lanceta descartável. A primeira gota de sangue foi desprezada para evitar contaminação com lactato eliminado no suor produzido pelas glândulas sudoríparas, e a seguir 25 μL de sangue arterializado foram coletados, utilizando-se de capilares de vidro heparinizados e calibrados. O sangue coletado foi depositado em microtubos contendo 50 μL de fluoreto de sódio 1%, que, por ser hipotônico, provoca a hemólise e também a inibição da enzima glicolítica enolase, interrompendo assim a atividade glicolítica, além de contribuir para evitar a coagulação sanguínea. O lactato sanguíneo foi

analisado por método eletro-enzimático no YSI 1500 Sport L-Lactate analyser (YSI Inc, Yellow Springs, Ohio).

6.5.7 Determinação do limiar anaeróbio

O limiar anaeróbio foi determinado a partir de um modelo de regressão bissegmentada (Toler 1990):

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 z_i x_i + \beta_2 (1 - z_i) x_i + e_i,$$

em que: y_i é a concentração de lactato na i -ésima potência;

$z_i = 0$ se $X_i \leq p_q$; e 1 se $X_i > p_q$;

X_i é a i -ésima potência; p_q é o ponto de quebra; e e_i é o erro aleatório associado a: y_i , $e_i \sim N(0; \sigma^2)$.

Neste modelo, o ponto de quebra (PQ) corresponde ao LA, que foi estimado juntamente com os demais parâmetros do modelo. Utilizou-se como estimativa de mínimos quadrados para este parâmetro o valor de PQ que conduziu ao menor quadrado médio do resíduo para o modelo. Portanto, o modelo matemático descrito acima, possibilitou a obtenção dos limiares anaeróbios de todas as variáveis utilizadas no trabalho.

6.5.8 Análise estatística

Aplicou-se teste-t de Student para amostras dependentes para verificar a existência de diferença significativa entre os limiares. A relação entre os limiares das variáveis foi avaliada a partir da análise de regressão linear simples. Fez-se análise de correlação de Pearson para os valores médios de cada variável (lactato, proteína total salivar, atividade da alfa-amilase e atividade elétrica do músculo), obtidos em todos os estágios de exercício até exaustão para avaliar o grau de associação entre elas. O estudo admitiu o nível de $P < 0,05$ para a significância estatística.

6.6 Resultados

Os limiares anaeróbios de lactato sanguíneo (LAL) e de proteína total salivar (PAT) foram observados em 100% (n=12), e 83% (n=10) dos voluntários, respectivamente. Os valores médios do LAL ocorreram com uma concentração de lactato de $2,10 \pm 0,58$ mmol/L e o PAT a uma concentração de proteína de $0,79 \pm 0,30$ mg/mL. A análise do limiar eletromiográfico (EMGlan) só foi possível em dez dos treze voluntários devido à interferências ocorridas na captação do sinal no decorrer do teste. A ocorrência do EMGlan no músculo vasto lateral direito foi observado em 60% (n=6) da amostragem, enquanto que nos demais músculos este evento foi bastante limitado.

Os valores do LAL, PAT, EMGlan expressos em watts (W) de cada voluntário foram determinados pelo modelo de regressão linear bissegmentado. A análise do limiar de proteína salivar foi utilizada para prever o limiar anaeróbio de acordo com a seguinte equação:

$$\text{LAL} = -30,35 + 1,2077 \times \text{PAT}$$

Conforme mostrado na Figura 1 observa-se uma alta concordância entre o modelo de regressão ajustado e os dados observados. No entanto, não houve diferença significativa entre os limiares.

As concentrações de lactato e proteína total salivar, a cada estágio de exercício, apresentaram um aumento médio de $4,7 \cdot 10^{-3}$ mmol/L e $6 \cdot 10^{-4}$ mg/mL, respectivamente do início do exercício até o ponto de limiar, e $4,4 \cdot 10^{-2}$ mmol/L e $8,4 \cdot 10^{-3}$ mg/mL a partir do limiar até o momento de exaustão. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre as concentrações dessas duas variáveis antes e após o ponto de limiar.

A relação dos valores médio da atividade da alfa-amilase com os valores médios da concentração da proteína total na saliva apresentaram correlação alta e significativa ($P < 0,01$) (Figura 2A). A correlação entre a atividade da alfa-amilase salivar e a concentração de lactato sanguíneo também mostrou-se alta e significativa ($P < 0,01$) (Figura 2B). Além disso, a atividade elétrica do músculo vasto lateral direito e a concentração de lactato apresentou alta correlação também significativa ($P < 0,01$) (Figura 2C).

O comportamento das variáveis investigadas apresentou atividade e concentração aumentada ao longo de todo o teste de esforço. Através da análise

de correlação (Tabela 1) entre os valores médios das concentrações de lactato e proteína total salivar, atividade da alfa-amilase, atividade elétrica dos músculos e frequência cardíaca observou-se alto coeficiente de correlação linear e $p < 0,05$. Isto indica uma grande associação entre essas variáveis durante o exercício com incremento de carga.

O eletromiograma da atividade elétrica do músculo vasto lateral direito e seus respectivos valores da raiz quadrada da média (RMS) expressos em microvolts no início, no meio e no final do teste com cargas crescentes em ciclo ergômetro está representado na Figura 5. Observa-se o quanto o sinal elétrico demandado do músculo se torna mais intenso à medida que aumenta a carga de exercício. Os valores de RMS são significativamente diferentes nas três etapas do teste com cargas crescentes.

O comportamento da concentração da proteína total salivar, lactato sanguíneo e atividade da alfa-amilase salivar durante o repouso, exaustão e após exercício foi apresentado na figura 3 com o objetivo de verificar as alterações destes parâmetros nestes três estágios. O teste-t de Student para amostras dependentes mostrou diferença significativa ($P < 0,01$) para as concentrações do lactato e proteína, e ($P < 0,05$) para a atividade da alfa-amilase salivar entre o momento de exaustão em relação ao repouso, exaustão em relação ao pós-exercício e pós-exercício em relação ao repouso. Adverte-se que os valores das concentrações das variáveis analisadas diminuem quinze minutos após o término do mesmo. Entretanto, estas não retornam os valores próximos ao pré-exercício com apenas 15 minutos de descanso. Esses dados confirmam que o estresse decorrente do exercício com incremento de carga até exaustão altera de maneira significativa os parâmetros aqui analisados, sugerindo que os mesmos poderiam ser biomarcadores do estresse físico.

O perfil de proteínas da saliva total de cada voluntário foi obtido por análise eletroforética em gel de poliacrilamida (Figura 4A). Este perfil em geral não alterou com o exercício, com exceção do polipeptídeo correspondente a alfa-amilase salivar que mostrou um aumento de sua concentração durante o exercício. Observa-se pela análise visual da intensidade da banda da alfa-amilase que à medida que aumentava a intensidade de exercício, a quantidade secretada da alfa-amilase salivar estaria aumentando. Estas alterações foram quantificadas

pela análise densitométrica da banda da alfa-amilase em cada estágio (Figura 4B), demonstrando que houve diferença significativa ($P<0,05$) entre a intensidade da alfa-amilase no início e final do exercício e também após quinze minutos do mesmo. Além disso, observou-se um ponto de quebra quando os resultados da IOD, referentes à banda da alfa-amilase foram plotados em relação à carga de trabalho. Esses dados ressaltam a influência da taxa de secreção da alfa-amilase sobre o fluido salivar durante exercício físico extenuante.

6.7 Discussão

As alterações decorrentes do exercício físico com cargas crescentes sobre biomarcadores salivares, neuromusculares e plasmáticos foram inter-relacionadas revelando as variações metabólicas advindas do exercício. Isso foi possível através da análise de correlação linear entre os limiares de lactato com os limiares de proteína total salivar e eletromiográficos. Como também pela comparação entre os valores médios da concentração de proteína total salivar, atividades da alfa-amilase salivar e elétrica do músculo e frequência cardíaca referentes a cada estágio de exercício. Além disso, comparou-se os valores médios de alguns desses parâmetros no momento de repouso, exaustão e no pós-exercício.

As alterações observadas nas concentrações de lactato, proteína total, alfa-amilase salivar e atividade eletromiográfica são resultantes de mecanismos bioquímicos e fisiológicos, que levam ao aumento destas variáveis. Uma possível explicação seria a influencia do sistema nervoso autônomo com a combinação tanto simpática quanto parassimpática sobre o músculo esquelético, por exemplo ativando a enzima glicogênio fosforilase o qual aumenta a velocidade da glicólise anaeróbia além de favorecer o recrutamento de unidades motoras alterando a atividade elétrica do músculo; (Hanon et al. 1998; Stainsby e Brooks, 1990). O mesmo se observa sobre as glândulas salivares aumentando, por exemplo, os níveis intracelulares de AMPc, o qual acentua a secreção salivar (Schneyer and Hall, 1991; Turner and Sugiy, 2002).

Os limiares anaeróbios de proteína total salivar, lactato sanguíneo e eletromiográficos foram avaliados neste estudo de forma individual utilizando um modelo matemático de regressão linear bissegmentado, no qual o ponto de quebra do modelo corresponde ao limiar anaeróbio. O limiar anaeróbio, neste modelo, é estimado via método de mínimos quadrados, juntamente com os demais parâmetros que apresentam uma maior precisão e acurácia em sua estimativa, quando comparada à simples inspeção visual dos dados. Os estimadores de mínimos quadrados são eficientes e não tendenciosos. Modelos semelhantes a estes foram propostos para uso em análises de adaptabilidade e estabilidade fenotípica (Toler 1990). Dentre os métodos para identificação de

limiar anaeróbio, destacam-se os que utilizam concentrações fixas de lactato (Kindermann et al. 1979; Heck et al, 1985), e a inspeção visual da curva “concentração de lactato versus carga de trabalho” (Hug et al. 2003; Lucia et al. 1997, Lucia et al. 2000, Schneider et al. 2000, Gaskill et al. 2001, Calvo et al. 1997, Chicharro et al. 1999). Entretanto, essas análises podem subestimar ou superestimar a intensidade do limiar anaeróbio (Tegtbur et al. 1993), comprometendo a eficácia dos resultados.

As análise dos limiares anaeróbios de lactato e de proteína total salivar demonstraram que estes parâmetros foram altamente correlacionáveis, sendo possível sua obtenção em todos os voluntários. Por outro lado, os limiares eletromiográficos (EMGlan) ocorreram em apenas 50% dos voluntários. Além disso, a obtenção do EMGlan foi mais proeminente no músculo vasto lateral direito. Estes dados estão de acordo com os estudos de Jorge e Hull (1986), que analisaram a atividade eletromiográfica de oito músculos durante exercício em bicicleta e constataram que as mudanças não lineares no sinal eletromiográfico não ocorreram para todos os músculos envolvidos no exercício, a não ser para o vasto lateral, reto femoral e sóleo. A ocorrência do EMGlan observado no presente trabalho é explicada pelo aumento da contribuição das unidades motoras de contração rápida para compensar o déficit das unidades motoras fadigadas e manter o suprimento energético para a contração muscular (Enoka and Stuart 1992; Hug et al. 2003)

Por outro lado, os limiares anaeróbios correspondentes à atividade da alfa-amilase salivar não foram observados como no trabalho de Calvo et al. 1997 que encontraram alta correlação entre a atividade da alfa amilase salivar com o lactato sanguíneo durante exercício em esteira. Uma possível explicação para esta diferença seria a necessidade de diluição da saliva para obtenção de leitura de densidade ótica dentro da faixa de linearidade do método de dosagem da atividade da alfa amilase associada ainda a alta viscosidade da saliva observada nos últimos estágios. Portanto, ao plotar os dados de atividade da alfa-amilase observou-se pontos bastante dispersos, não sendo possível a determinação do momento correspondente ao limiar anaeróbio.

Por outro lado, através da análise do perfil eletroforético das proteínas totais da saliva total observou-se um aumento gradual da banda correspondente à

alfa-amilase salivar até o momento de exaustão e drástica diminuição após 15 minutos de repouso, sugerindo um controle autonômico sobre as glândulas salivares aumentando a secreção desta enzima durante o exercício físico (Nater et al., 2005). Aparentemente, a análise do perfil de proteínas nos diferentes estágios de exercício revelou que este efeito estimulador foi específico para a alfa-amilase, uma vez que o mesmo não se detectou sobre as demais proteínas salivares. A quantificação da banda da alfa-amilase por análise densitométrica confirmou o aumento significativo da concentração da alfa-amilase no momento de exaustão em relação ao repouso assim como sua diminuição 15 minutos após o mesmo. Além do mais, ao plotar os resultados da densitometria ótica integrada (IOD) da banda da alfa-amilase de cada voluntário em relação à carga de trabalho encontrou-se um limiar correspondente ao aumento da intensidade da banda, sendo este correlacionável aos limiares anaeróbio de lactato e proteína total salivar (PAT). Sendo assim, acreditamos que o aumento específico na concentração da alfa-amilase salivar, observado na eletroforese, reflita sobre a concentração das proteínas totais da saliva influenciando assim sobre a obtenção do limiar de proteína na saliva. Além disso, a relação do aumento da concentração da alfa-amilase salivar pela análise eletroforética com a cinética do lactato sanguíneo durante exercício físico não foi anteriormente mostrado na literatura.

A correlação obtida entre os valores médios da alfa-amilase salivar e proteína total ao longo de todo o teste mostrou que estas são altamente correlacionáveis. A atividade da alfa-amilase salivar é indicativa de níveis de estresse e especula-se que sua mensuração possa substituir métodos convencionais, como pressão arterial e batimento cardíaco (Rohleder et al. 2004; Yamaguchi et al. 2004; Nater et al. 2005). Sugere-se que a alfa-amilase reflita as alterações catecolaminérgicas devido ao aumento na atividade do sistema nervoso simpático adrenomedular (Chatterton et al. 1996; Rohleder et al. 2004). Com base na correlação e confiabilidade dos dados apresentados neste trabalho, propõe-se que, a análise da concentração das proteínas totais salivares também seria um bom indicativo de estresse.

A atividade da alfa-amilase salivar, concentração de proteína total salivar e concentração de lactato sanguíneo aumentam significativamente do repouso até o

último estágio de exercício e diminuem também de forma significativa 15 minutos após o término deste. Observa-se então que o exercício induz alterações agudas sobre a concentração destes biomarcadores, os quais retornam rapidamente a níveis significativamente inferiores 15 minutos após o término do teste. Além da influencia das catecolaminas plasmáticas sobre a secreção salivar (Rohleder et al 2004; Nater et al. 2005) especula-se que estas também influenciem na concentração do lactato sanguíneo. Por exemplo, Schneider et al. 2000, correlacionaram à concentração do lactato sanguíneo com a concentração de epinefrina e noraepinefrina durante exercício físico e observaram alta correlação entre as variáveis analisadas. Isto sugere, que o aumento da atividade simpática, induzida pelo exercício, altere tanto a secreção das glândulas salivares, quanto a atividade metabólica do músculo esquelético, e que as mesmas tendem a retornar aos níveis de repouso após do estímulo do exercício.

Conclui-se que os biomarcadores salivares e neuromusculares são influenciados pelo exercício físico em cicloergômetro com cargas crescentes até exaustão. As alterações na concentração de proteína total da saliva total durante o exercício físico e sua correlação com o limiar do lactato sanguíneo permitem predizer a intensidade de exercício que corresponde ao limiar anaeróbio. A utilização do limiar eletromiográfico também apresentou uma alta correlação com o limiar anaeróbio de lactato, porém em número reduzido de voluntários, indicando a necessidade de novos estudos. Finalmente, sugerimos também, que a concentração de proteína total na saliva reflete a concentração e/ou atividade da alfa-amilase salivar, podendo a sua determinação ser mais uma alternativa para se avaliar níveis de estresse, pelo menos no teste de esforço progressivo em cicloergômetro avaliado nesse trabalho.

6.8 Referencia Bibliográfica

1. Andreassen S, Rosenfalck A (1978) Impaired regulation of the firing pattern of single motor units. **Muscle Nerve** 1:416-8
2. Andriacchi TP, Andersson GB, Ortengren R, Mikosz RP (1984) A study of factors influencing muscle activity about the knee joint. **J Orthop Res** 1:266-75
3. Basmajian JV (1973) Control of individual motor units. A guide and preliminary reading for prospective subjects in single motor unit training experiments. **Am J Phys Med** 52:257-60
4. Basmajian JV, De Luca CJ (1985) Upper Limb. In: *Muscles Alive: their function revealed by electromyography*. 5 ed. Baltimore: Williams and Wilkins,. Chapter 12, 265-289
5. Bishop NC, Blannin AK, Armstrong E, Rickman M, Gleeson M (2000) Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. *Med Sci Sports Exerc* 32:2046-51
6. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1:248-54
7. Calvo F, Chicharro JL, Bandrés F, Lucia A, Peres M, Álvares J, Mojares LL, Vaquero AF, Legido JC (1997) Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. **Can J Appl Physiol** 22:553-561
8. Chatterton RTJr, Vogelsong KM, Lu YC, Ellman AB, Hudgens GA (1996) Salivary alpha-amylase as a measure endogenous adrenergic activity. **Clin Physiol** 16:433-48
9. Chicharro JL, Lucia A, Pérez M, Vaquero AF, Urena R (1998) Saliva composition and exercise. **Sports Méd** 26:17-27

10. Chicharro JL, Perez M, Carvajal A, Bandres F, Lucia A (1999) The salivary amylase, lactate and electromyographic response to exercise. **Jpn J Physiol** 49:551-554
11. Edwards RG, Lippold OCJ (1956) The relation between force and integrated electrical activity in fatigued muscle. **J Physiol** 132: 677-81
12. Enoka RM, Stuart DG (1992) Neurobiology of muscle fatigue. **J Appl Physiol** 72:1631-48.
13. Gaskill SE, Ruby BC, Walker AJ, Sanchez OA, Serfass RC, Leon AS (2001) Validity and reliability of combining three methods determine ventilatory threshold. **Med Sci Sports Exerc** 33:1841-1848
14. Gilman S, Thornton R, Miller D, Biersner R (1979a) Effects of exercise stress on parotid gland secretion. **Horm Metab Res** 11:454
15. Gilman SC, Fischer GJ, Biersner RJ, Thornton RD, Miller DA (1979b) Human parotid alpha-amylase secretion as a function of chronic hyperbaric exposure. **Undersea Biomed** 6:303-307
16. Hanon, C, Thepaut-Marthieu C, Le Chevalier, JM (1998) Electromyogram as an indicator of neuromuscular fatigue during incremental exercise. **Eur J Appl Physiol** 78: 315-323
17. Hanten WP, Schulthies SS (1990) Exercise effect on electromyographic activity of the vastus medialis oblique and vastus lateralis muscles. **Phys Ther** 70:561-5
18. Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W (1985) Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. **Int J Sports Med** 6:117-30
19. Hug F, Faucher M, Kipson N, Jammes Y (2003) EMG sings of neuromuscular fatigue related to the ventilatory threshold during cycling exercise. **Clin Physiol Funct Imaging** 23:208-214
20. Jorge M, Hull ML (1986) Analysis of EMG measurements during bicycle pedalling. **J Biomech** 19:683-94

21. Kindermann W, Simon G, Keul J (1979) The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol** 42:25-34
22. Laemmli UK, Favre M (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. **J Mol Biol** 80:575-99
23. Lucia A, Hoyos J, Perez M, Chicharro JL (2000) Heart rate and performance parameters in elite cyclists: a longitudinal study. **Med Sci Sports Exerc** 32:1777-1782
24. Lucia A, Sanches O, Carvajal A, Chicharro JL (1999) Analysis of the aerobic-anaerobic transition in elite cyclists during incremental exercise with the use of electromyography. **Br J Sports Med** 33:178-85
25. Lucia A, Vaquero AF, Perez M, Sanches O, Sanchez V, Gemez MA, Chicharro JL (1997) Electromyographic response to exercise in cardiac transplant patients. **Chest** 111:1571-1576
26. Moritani T, Takaishi T, Matsumoto T (1993). Determination of maximal power output at neuromuscular fatigue threshold. **J Appl Physiol** 74:1729-34
27. Moritani T, Nagata A, Muro M (1982) Electromyographic manifestations of muscular fatigue. **Méd Sci Sports Exerc** 14:198-202
28. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, Ehlert U (2005) Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. **Int J Psychophysiol** 55:333-42
29. Navazesh M. Methods for collecting saliva (1993) *Ann N Y Acad Sci, Saliva as a diagnostic fluid.* 694:72-77
30. Nexø E, Hansen MR, Konradsen L (1988) Human salivary epidermal growth factor, haptocorrin and amylase before and after prolonged exercise. **Scand J Clin Lab Invest** 48:269-273
31. Petrofsky JS (1979) Frequency and amplitude analysis of the EMG during exercise on the bicycle ergometer. **Eur J Appl Physiol** 41: 1-15

32. Rohleder N, Nater UM, Wolf JM, Ehlert U, Kirschbaum C (2004) Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase: an indicator of sympathetic activity?. **Ann N Y Acad Sci** 1032:258-63
33. Schneider DA, Mclellan TM, Gass GC (2000) Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. **Med Sci Sports Exerc** 32:608-613
34. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV (1995) Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Crit Rev Oral Biol Med** 6:161-75
35. Schneyer CA, Hall HD (1991) Effects of varying frequency of sympathetic stimulation on chloride and amylase levels of saliva elicited from rat parotid gland with electrical stimulation of both autonomic nerves. **Proc Soc Exp Biol Med** 196:333-7
36. Schwartz SS, Zhu WX, Sreebny LM (1995) Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. **Arch Oral Biol** 40:949-58
37. Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ (2001) Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. **Psychoneuroendocrinology**. 26:165-73
38. Speirs RL, Herring J, Cooper WD, Hardy CC, Hind CR (1974) The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland. **Arch Oral Biol** 19:747-52
39. Stainsby WN, Brooks GA (1990) Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. **Exerc Sport Sci Rev** 18:29-63
40. Steerenberg PA, Van Asperen IA, van Nieuw Amerongen A, Biewenga A, Mol D, Medema GJ (1997) Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. **Eur J Oral Sci** 105:305-9
41. Streckfus CF, Bigler LR (2002) Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Dis** 8:69-76.
42. Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM (1993) Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Méd Sci Sports Exerc** 25:620-627

43. Toler JE (1990) Patterns of genotypic performance over environmental arrays. Clemson University, US 154f. phd-tesis Biol
44. Turner RJ, Sugiya H (2002) Understanding salivary fluid and protein secretion. **Oral Dis.** 8:3-11
45. Viitasalo JH, Komi PV (1997) Signal characteristics of EMG during fatigue. **Eur J Appl Ogtsuik Occup Physiol** 37:111-21
46. Walsh NP, Blannin AK, Clark AM, Cook L, Robson PJ, Gleeson M (1999) The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. **J Sports Sci** 17:129-134
47. Walsh NP, Montague JC, Callow N, Rowlands AV (2003) Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. **Arch Oral Biol** 49:149-154
48. Yamaguchi M, Kanemori T, Kanemaru M, Takai N, Mizuno Y, Yoshida H (2004) Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. **Biosensors and Bioelectronics** 20:491-497.

7 Tabela 1. Correlação entre os valores médios das variáveis analisadas: concentração de lactato (LAC), proteína total salivar (PROT), atividade da alfa-amilase (AMY), atividades elétrica dos músculos vasto lateral direito (EMGvld),

	AMY	PROT	LAC	EMGvld	EMGvle	EMGvme	EMGvmd
AMY							
PROT	0,95						
LAC	0,81	0,96					
EMGvld	0,91	0,95	0,93				
EMGvle	0,84	0,90	0,85	0,98			
EMGvme	0,79	0,84	0,83	0,92	0,90		
EMGvmd	0,94	0,97	0,95	0,99	0,96	0,88	
FC	0,79	0,86	0,82	0,96	0,98	0,96	0,93

vasto lateral esquerdo (EMGvle), vasto medial esquerdo (EMGvme) e vasto medial direito (EMGvmd) e frequência cardíaca (FC).

$P < 0,05$ para todas as correlações

8 Legendas:

Figura 1: Relação entre os limiares de lactato, proteína total salivar e eletromiográfico.

(A) Relação entre os limiares de lactato (LAL) e de proteína total salivar (PAT) expressos em watts (W); (B) Relação entre o limiar eletromiográfico (EMG_{lan}) determinado pela análise do RMS do músculo vasto lateral direito (VLD) com o limiar de lactato expressos em watts. As linhas superiores e inferiores representam o intervalo de confiança (95%) para os valores preditos pela equação de regressão (linha central). O (r) representa o coeficiente de correlação linear entre as variáveis analisadas.

Figura 2: Correlação entre os valores médios da atividade da alfa-amilase salivar e concentração do lactato sanguíneo (A), da atividade da alfa-amilase salivar e proteína total (B) e atividade elétrica do músculo vasto lateral direito e concentração do lactato sanguíneo (C). As linhas superiores e inferiores representam o intervalo de confiança (95%) para os valores preditos pela equação de regressão (linha central). O (r) representa o coeficiente de correlação linear entre as duas variáveis.

Figura 3: Comportamento da concentração da proteína total salivar, lactato sanguíneo e atividade da alfa-amilase salivar durante o repouso, exaustão e após exercício.

Os gráficos A, B e C mostram os valores médios absolutos ($\pm$ desvio padrão) das concentrações do lactato sanguíneo (LAC) e proteína total salivar (PROT) e a atividade da alfa-amilase salivar (AMY) nos momentos de repouso (REP), exaustão, último estágio (EXAU) e pós exercício, 15 minutos após o último estágio (P_EX). Δ Indica diferença para $P < 0,05$ entre os momentos de exaustão e repouso. $\blacklozenge$ Indica diferença para $P < 0,05$ entre o período pós-exercício e repouso. $\blackspade$ Indica diferença para $P < 0,05$ entre o momento de exaustão e o pós-exercício. DP= Desvio Padrão e EP = Erro Padrão.

Figura 4: Efeito do exercício sobre o perfil eletroforético da saliva total (A) e análise densitométrica da alfa-amilase salivar (B).

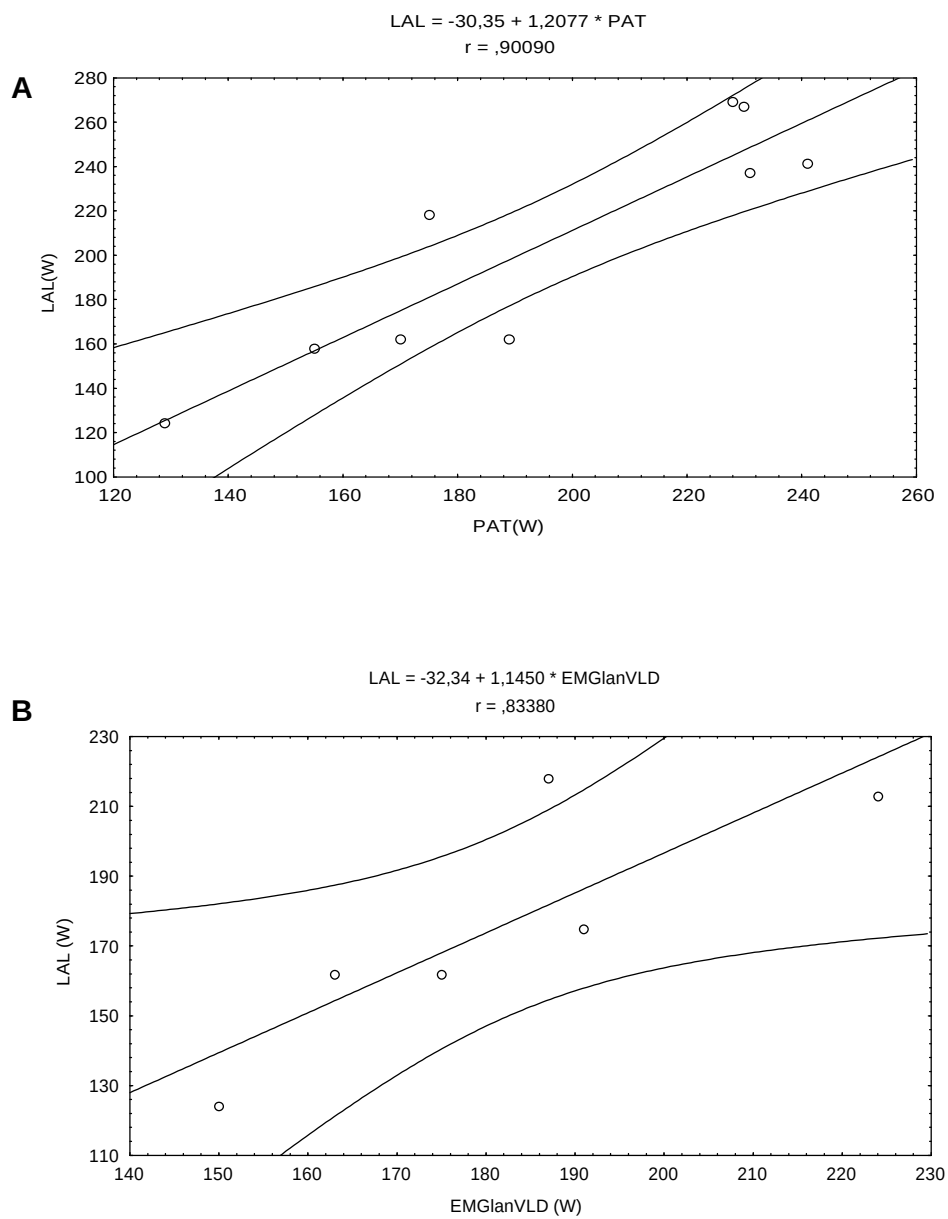
(A) Imagem digitalizada do gel corado com Comassie blue-R250 contendo 3 μ g de proteína total da saliva por *lane*, correspondente a cada estágio de exercício em watts (50 ,75, etc.). R5 e R15 são amostras coletadas durante o 5º e 15º min pós-exercício. A banda corada com maior intensidade representa a isoforma da alfa-amilase salivar humana (AMY). MW indica o padrão de proteínas utilizadas com suas respectivas massas moleculares relativas indicadas pelos números à esquerda do gel.

(B) Histograma dos valores médios e desvio padrão (n=8) da análise densitométrica da alfa-amilase salivar em cada estágio de exercício expresso em watts (w) e durante o repouso (R5 e R15). * Indica diferença significativa ($P<0,05$) entre o momento de exaustão, repouso e pós exercício.

Figura 5: Eletromiograma representativo (de um voluntário) da atividade elétrica do músculo vasto lateral direito (VLD) e seus respectivos valores de RMS expressos em microvolts no início, no meio e no final do teste com cargas crescentes em cicloergômetro.

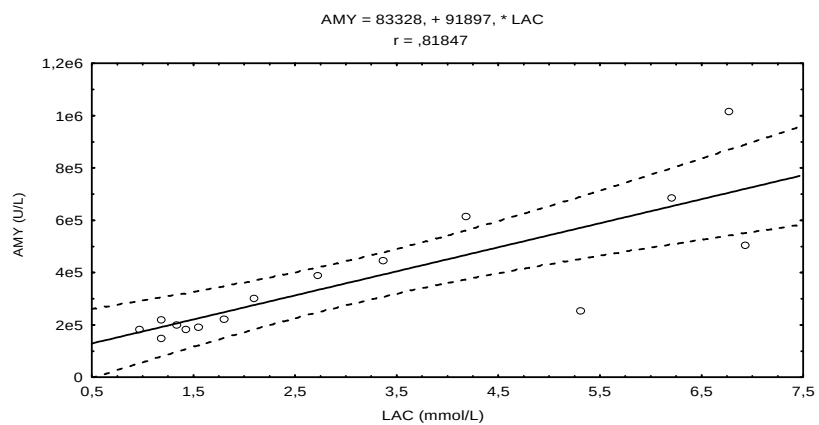
9 Ilustrações

9.1 Figura 1

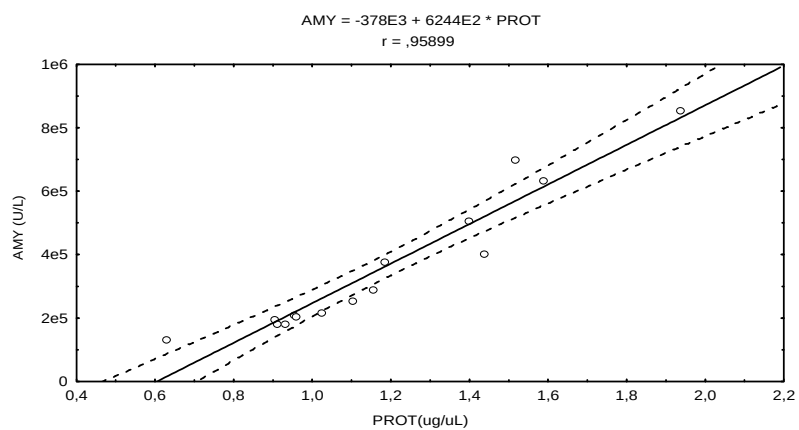


9.2 Figura 2

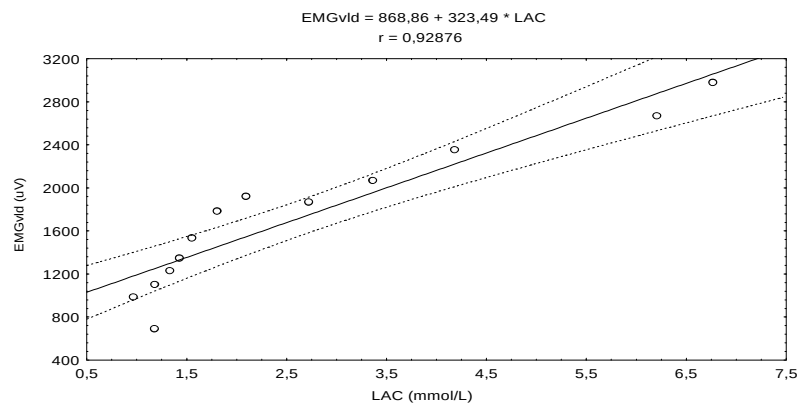
A



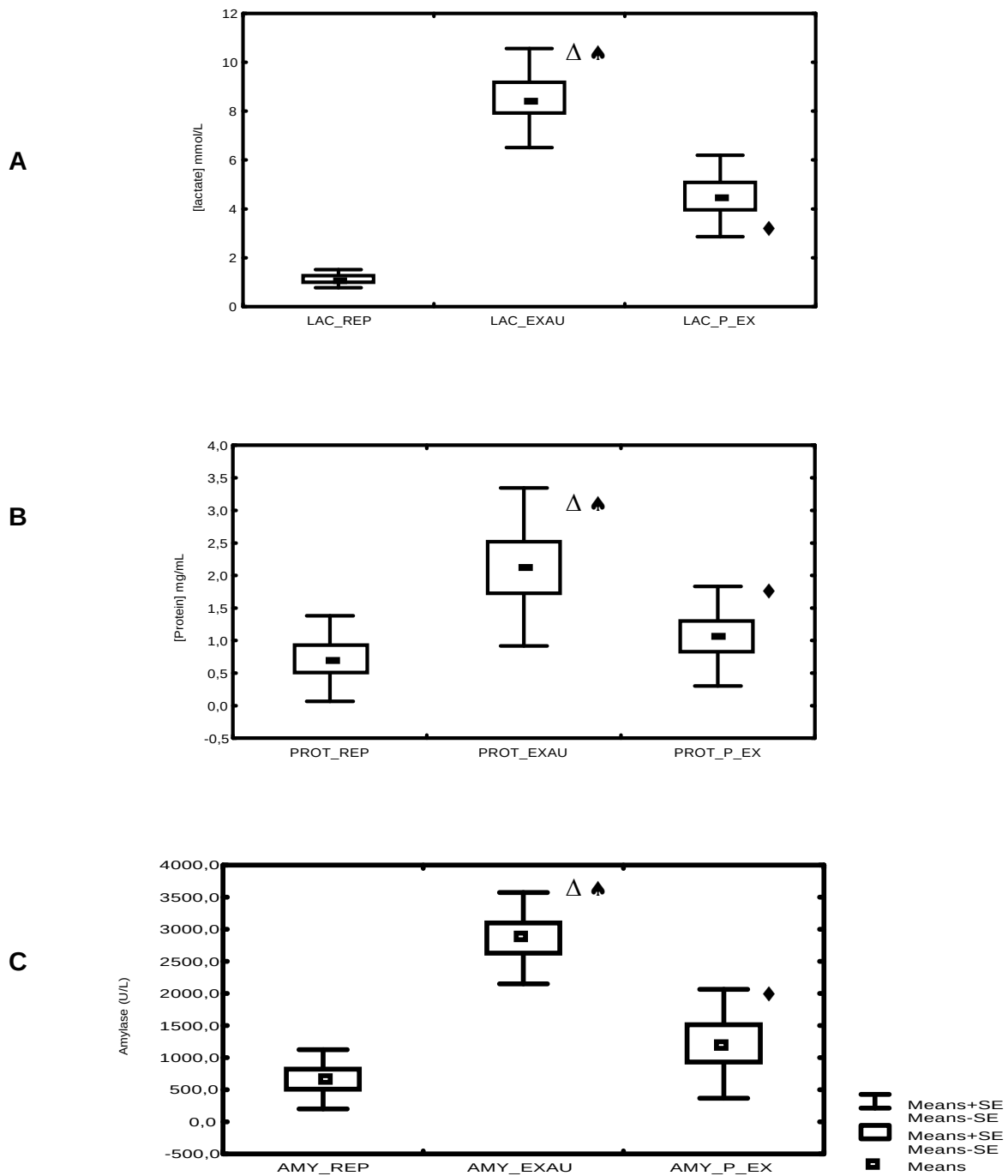
B



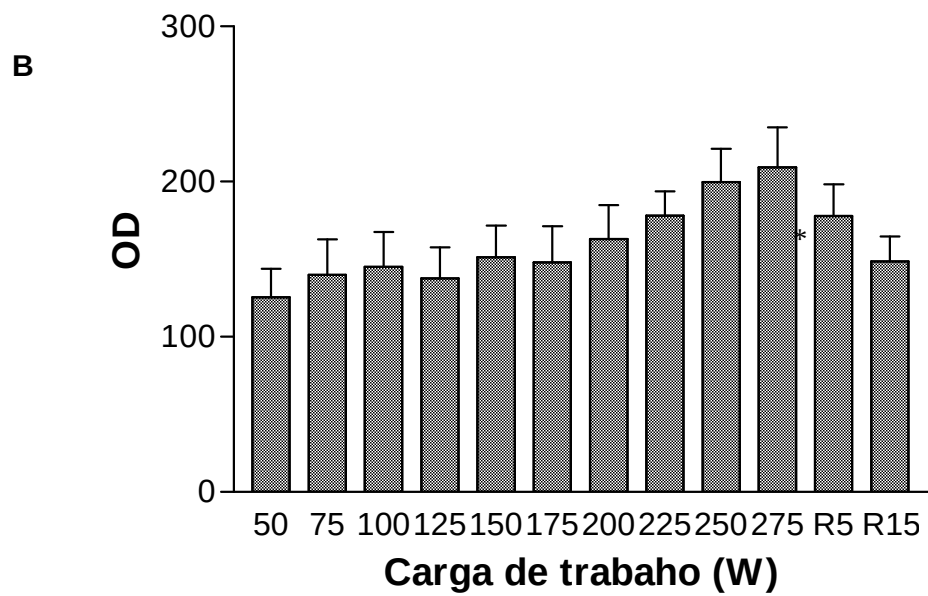
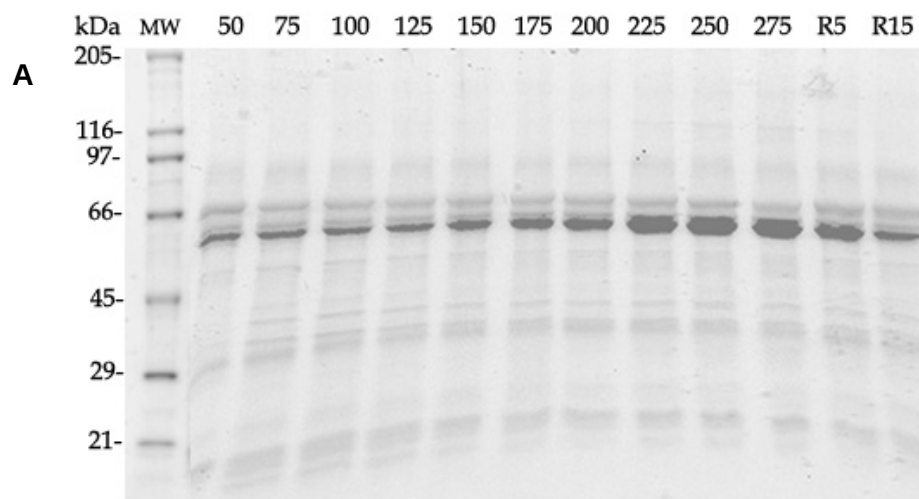
C



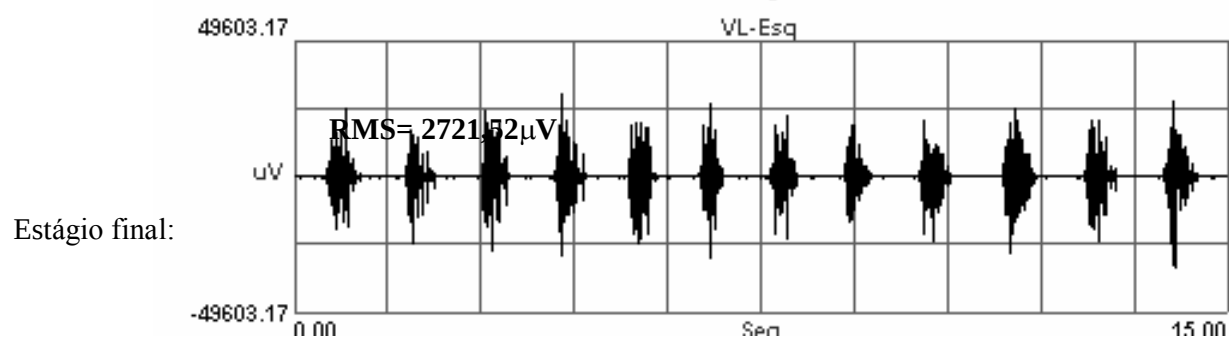
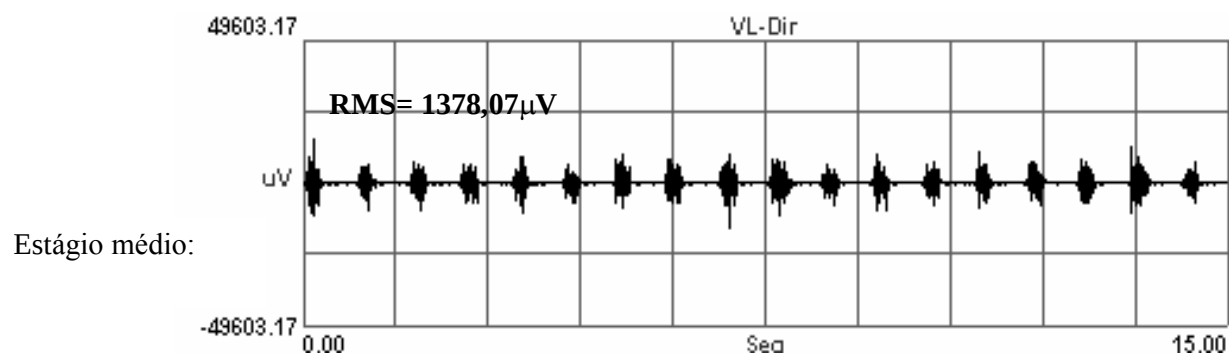
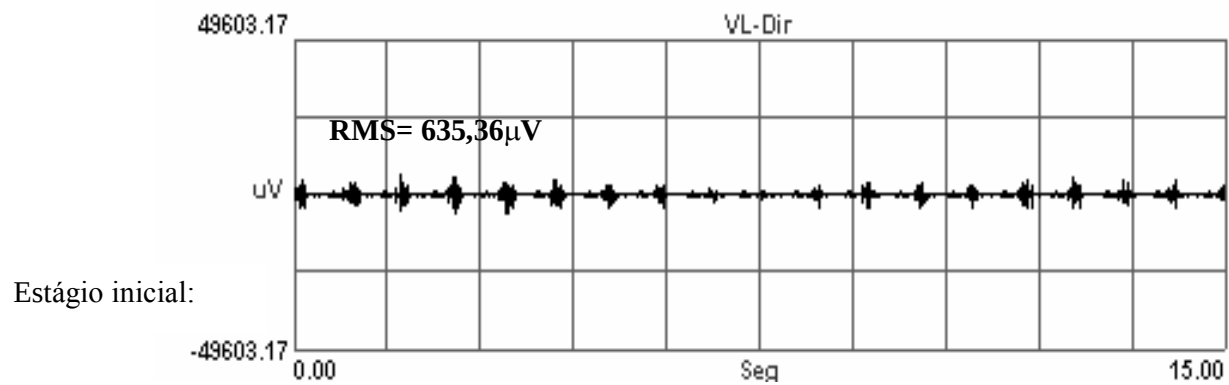
9.3 Figura 3



9.4 Figura 4



9.5 Figura 5



10 Conclusão Geral

- Os biomarcadores salivares e neuromusculares são influenciados pelo exercício físico em cicloergômetro com cargas crescentes até exaustão.
- As alterações na concentração de proteína total da saliva total durante o exercício físico e sua correlação com o limiar do lactato sanguíneo permitem prever a intensidade de exercício que corresponde ao limiar anaeróbio.
- A utilização do EMGlan mesmo tendo apresentado uma alta correlação com o LAL, ainda precisa ser melhor investigado, pois sua análise possibilitou averiguar a presença do LAN em apenas 60% da amostragem.
- Sugerimos ainda, a utilização da concentração de proteína total na saliva juntamente com a alfa amilase salivar como indicativos de estresse.
- Ressalta-se a necessidade de verificar o comportamento das proteínas totais da saliva sob mais condições estressantes.

11.1 ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.

11.2 ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Eu _____, RG _____
 _____, nascido em ____/____/____ e domiciliado à
 _____ município de
 _____, usuário (ou responsável legal pelo usuário
 _____), declaro que consinto em

participar como voluntário do Projeto de pesquisa. "BIOMARCADORES SALIVARES, METABÓLICOS E NEUROMUSCULARES COMO DETERMINANTES DO LIMAR ANAERÓBIO" sob coordenação do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, e análise bioquímica Vanessa Neves de Oliveira. Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que: a) o estudo será realizado com amostras de saliva (Método de cuspe) e sangue (lobo da orelha, 25µL) para pesquisa de biomarcadores na saliva; b) posso consultar o pesquisador em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone (0XX) 34 3226-1413, para esclarecimento de quaisquer dúvidas; c) estou livre para a qualquer momento deixar de participar da pesquisa sem apresentar justificativa e sem prejuízo a minha pessoa; d) todas as informações por mim fornecidas e os resultados individuais obtidos serão mantidos em sigilo e que os resultados coletivos serão divulgados em reuniões e revistas científicas; e) Este estudo será importante na investigação de biomarcadores salivares correlacionados aos plasmáticos; f) Estou plenamente informado do projeto, conforme a Carta de Esclarecimento, previamente lida por mim e discutida com o responsável.

Assim, consinto em participar do Projeto de Pesquisa em questão.

_____, _____ de _____ de _____.

Usuário/Responsável legal

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola\ Coordenador

Obs: Este termo apresenta-se em duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante legal e a outra ao Pesquisador.

Professor: Vanessa Neves de Oliveira

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular.

Endereço: Rua Acre - Bloco 2E39A – Campus Umuarama
CEP- 38400-982-Uberlândia- MG.

11.3 ANEXO III- CARTA DE ESCLARECIMENTO

Uberlândia (MG), 17 de julho de 2002

Prezado senhor,

gostaríamos de informá-lo que será realizada uma pesquisa que procurará estudar os biomarcadores salivares durante o exercício físico. O objetivo desse trabalho é o de efetuar um estudo do exercício físico, relacionando a influência das substâncias endógenas expressas na saliva com as do sangue e avaliando a qualidade e intensidade de atividades físicas programadas. O desenvolvimento do projeto dar-se-á em um teste agudo em cicloergômetro para avaliação física, coletando-se saliva e sangue. O período previsto de duração deste projeto é de 2 meses, sendo avaliados 2 voluntários por dia (de acordo com a disponibilidade do laboratório de fisiologia no campus Educação Física da Universidade Federal de Uberlândia), sob a responsabilidade geral do Prof Dr. Foued Salmen Espindola, de análise bioquímica da Prof. Vanessa Neves de Oliveira. Vimos através desta pedir-lhe que participe desta pesquisa como voluntário, a sua participação é muito importante para que possamos investigar as relações das substâncias encontradas na saliva com a atividade física. Em caso de dúvida ou alguma orientação, entre em contato com o Prof Dr. Foued Salmen Espindola ou com a Prof Vanessa Neves de Oliveira (0xx34) 3226-1413 em Uberlândia/MG.

Antecipadamente agradecemos a sua atenção.

Atenciosamente,

Prof Dr. Foued Salmen Espindola

11.4 ANEXO IV – NORMAS DA PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA PARA CONFEÇÃO DA VERSÃO FINAL DO MESTRADO (www.cogeb.ufu.br)

I. Capa

Capa dura, encadernação em azul marinho, letras em prata (ao menos para os 02 exemplares a serem entregues à Secretaria do Curso).

Na Capa deve constar:

- Universidade Federal de Uberlândia;
- Instituto de Genética e Bioquímica;
- Pós-Graduação em Genética e Bioquímica;
- Título da Tese;
- Nome do aluno;
- Uberlândia-MG;
- Ano da Defesa.

No Dorso do exemplar deve constar:

- nível (Mestrado ou Doutorado);
- nome do aluno;
- ano da defesa.

II. Papel

- Tamanho A4

Margens

Superior	3,0cm
Inferior	2,5cm
Esquerda	3,0cm
Direita	2,5cm

Fonte: Arial 12, espaço 1,5 ou 24 pontos.

III. Conteúdo e Ordenação do Conteúdo

O Mestrado e o Doutorado serão escritos sob a forma de **Capítulo(s)** e deverão ser instruídos por:

- 1 Capa (exemplo às fls.19);
- 1 Contra capa identificando: Curso, Título, Aluno, Orientador, Informes sobre a titulação, cidade e ano. (exemplo fls.20);
- Ficha Catalográfica: Deve ser colocada no verso da CONTRA CAPA (exemplo fls. 21);
- Folha de Rosto com Curso, Título, Aluno, Comissão Examinadora, termo do Orientador, Cidade e Data (exemplo fls. 22);
- Dedicatória;
- Agradecimentos;
- Índice/Sumário;
- Lista de Abreviaturas;
- Resumo Geral (abrangendo o(s) Capítulo(s));
- Introdução Geral (aborda o tema de Pesquisa, situando-o em um contexto geral sobre o conhecimento no assunto e apresenta o Objetivo Geral);
- Referências Bibliográficas;

Capítulo I :

- Título
- Cada Capítulo (01 ou mais de 01) deve ser escrito em conformidade com uma Revista de Divulgação Científica escolhida pelo Aluno e seu Orientador e, em linhas gerais, deve conter:
 - Introdução (breve, de acordo com as normas da Revista escolhida, abrangendo aspectos específicos relacionados ao Capítulo e que pode ou não ser retirada da Introdução Geral);
 - Abstract/ Resumo;
 - Material e Métodos;
 - Resultados e Discussão (conforme a Revista);
 - Referências Bibliográficas.

- Conclusão Geral:

ao final da Dissertação/Tese, como fechamento, referente ao(s) assunto(s) tratado(s) no(s) Capítulo(s).

- ANEXOS

1. Anexar, ao final da Dissertação/Tese, os Protocolos utilizados na Metodologia para desenvolvimento da Pesquisa.
2. Se o trabalho referente ao Capítulo estiver aceito ou publicado, anexá-lo.

11.5 ANEXO V- NORMAS DA EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY

Legal Requirements

The author(s) guarantee(s) that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright owners, that the rights of third parties will not be violated, and that the publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Authors wishing to include figures or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers.

Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Manuscripts submitted for publication must contain a statement (at the beginning or at the end of the Methods section) to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964

Declaration of Helsinki. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

Reports of animal experiments must state that the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 86-23, revised 1985) were followed, as well as specific national laws (e.g. the current version of the German Law on the Protection of Animals), where applicable.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false

statements or
for failure to fulfil the above-mentioned requirements.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the abovementioned requirements. The authors will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements.

European Journal of Applied Physiology is published as a Springer Online First publication. Online First articles are published within the Springer online service (springerlink.com) in a temporary directory. Before publication of the printed version, only the final page numbers, the citation line and the date of online publication are added.

A. Editor-in-Chief:

Prof. Dr. Pietro E. di Prampero,
Department of Biomedical Sciences
and Technology,
University of Udine,
Piazzale Kolbe 4, 33100 Udine, Italy
e-mail: ejap@makek.dstb.uniud.it
Tel: + 39-(0)432-494330;
Fax: +39-(0)432-494301

B. Manuscript submission: Authors are requested to submit their manuscripts in English via the journal's manuscriptCentral site at <http://ejap.manuscriptCentral.com>

C. Manuscripts must be accompanied by the Copyright Transfer Statement (springeronline.com/journal/00421). A signed copy of the Copyright Transfer Statement must be transmitted by fax and by mail to the Editor in Chief upon submission of the manuscript. The review process will not be initiated until a copy of the Copyright Transfer Statement has been received by the Editorial Office.

Manuscript Structure

All manuscripts are subject to copy editing. To facilitate rapid publication manuscripts should be prepared carefully in accordance with the following requirement. The elements of the manuscript are to be arranged in the following sequence:

Title page (numbered as page 1)

- Abstract
- Key-words
- Introduction
- Methods
- Technique or Case histories
- Results
- Discussion (comments and comparison with other published results)
- Acknowledgements
- References
- Tables
- Legends
- Illustrations.
-

The title page should contain:

■

1. The names of the authors.
2. The title of the paper.
3. The authors' affiliations. Addresses should be complete and may be given in the local language. An envelope symbol should be used to indicate the author to whom correspondence should be sent.
4. The fax and e-mail numbers of the corresponding author.

Page 2 should start with a concise, factual

■

Abstract of the most important results and conclusions in no more than 250 words.

■

Immediately following the abstract no more than 5 Key-words are to be supplied for subject indexing. They should not simply be taken from the title of the article but should be representative of the content of the whole article and characteristic of the terminology used within the particular field of study. They should be taken from Index Medicus (Medical Subject Headings) or, failing this, be composed by analogy on the same principle.

All abbreviations should be explained in parentheses after the full written-out version of what they stand for on their first occurrence in the Abstract and again in the main body of the text. All unit abbreviations should use the power convention, e.g. l min^{-1} .

Systeme international d'unites (SI). SI units should be used for the numerical expression of the results of measurements. In cases in which the SI unit is different from the conventional one, the conventional unit should be added in parentheses; e.g., 12 kPa (90 mm Hg). Authors are referred to the Glossary of terms for thermal physiology published in Volume 57, Number 1 of the journal.

Footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

■

References

The list of references should include only works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications should be mentioned in the text only. Journal titles should be abbreviated according to Index Medicus.

References should be cited by author and year in the text (e.g. Hammer 1994; Hammer and Sjoqvist 1995; Hammer et al. 1993) and listed in alphabetical order in the reference list.

Examples:

References with correct punctuation should be styled as follows:

■ Kirtley ME, Sumbilla C, Inesi G (1990) Mechanisms of calcium uptake and release by sarcoplasmic reticulum. In: Bronner F (ed) Intracellular calcium regulation. Wiley-Liss, New York, pp 249–270

■ Ruegg JC (1992) Calcium in muscle contraction. Springer, Berlin, Heidelberg, New York

■ Forte R, De Vito G, Figura F (2003) Effects of dynamic resistance training on heart rate variability in health older women. Eur J Appl Physiol 89: 85–89

If available the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question.

Illustrations and Tables

■ All figures (photographs, graphs or diagrams) and tables should be cited in the text, and each numbered consecutively throughout. Lowercase letters (a, b etc.) should be used to identify figure parts. If illustrations are supplied with

uppercase labeling, lowercase letters will still be used in the figure legends and citations.

Half-tone illustrations (black and white and colour). For colour illustrations the authors will be expected to make a contribution (485, US \$ 435, plus 16% VAT) towards the extra costs, irrespective of the number of colour figures.

Magnification should be indicated by scale bars. Details that might identify patients should be omitted unless absolutely necessary for scientific reasons. Falsification or altering of data should never be used as a means of ensuring anonymity; masking of the eye region in photographs of patients may be inadequate. If identification of patients is unavoidable, the author must guarantee that the reproduction of illustrations in which a patient is recognizable is approved either by the patient him-/herself or by his/her legal representative.

Figure legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text.

Tables should have a title and a legend explaining any abbreviation used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

The preferred figure formats are EPS for vector graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure. The file name (one file for each figure) should include the figure number. Figure legends should be included in the text and not in the figure file.

Scan resolution: Scanned line drawings should be digitized with a minimum resolution of 800 dpi relative to the final figure size. For digital halftones, 300 dpi is usually sufficient.

Colour illustrations: Store colour illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.

Preparing your Manuscript

Please follow the instructions provided in the Author Center of ManuscriptCentral.

Layout guidelines

1. Use a normal, plain font (e.g., Times Roman) for text.

■ Other style options:

- for textual emphasis use italic types.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

2. Do not use field functions.

■

3. For indents use tab stops or other commands, not the space bar.

■

4. Use the table functions of your word processing program, not spreadsheets, to make tables.

■

5. Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.

■

6. Place any figure legends or tables at the end of the manuscript.

■

7. Submit all figures as separate files and do not integrate them within the text.

■

Data formats

- Prepare your manuscript using a word processing program and save it as a
- .doc, .rtf or .ps file. You may also upload .xls or .ppt supplemental files as part of the manuscript submission process. All of these files will be automatically converted to .pdf format. Image files such as .gif, .jpg, .eps, .png, and .tif may be uploaded. These will be converted to small .jpg files. In any case, a .doc, .rtf or .ps file must be uploaded.

Electronic Supplementary Material

Electronic supplementary material (ESM) for an article in the journal will be published in SpringerLink provided the material is:

- submitted to the Editor(s) in electronic form together with the paper and is subject to peer review.

- accepted by the journals Editor(s).

-

ESM may consist of:

- information that cannot be printed animations, video clips, sound recordings.

-

- information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.

-

- large original data that relate to the paper e.g. additional tables, illustrations (color and black & white), etc.

After acceptance by the journals Editor(s) ESM will be published as received from the

Short Communications

Short communications are limited to 3 printed pages (ca. 12,000 characters), including a maximum of two figures/tables and 8 references.

Proofreading

Authors should make their proof corrections on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum,

which will be hyperlinked to the article. The author is entitled to formal corrections only. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the appropriate editor before returning the proofs to the publisher.

Offprints

Two (2) complimentary copies of the journal issue in which the article is published will be supplied, free of charge, to the corresponding author. Orders for offprints can be placed by returning the order form with the correct proofs. When you order offprints, you are entitled to receive in addition a pdf file of your article for your own personal use.