



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

EXERCÍCIO FÍSICO E SAÚDE

Estudante: Romeu Paulo Martins Silva

UBERLÂNDIA, MG

2011



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

EXERCÍCIO FÍSICO E SAÚDE

Estudante: **Romeu Paulo Martins Silva**

Orientador: **Nilson Penha-Silva**

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

UBERLÂNDIA, MG

2011



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

EXERCÍCIO FÍSICO E SAÚDE

Estudante: **Romeu Paulo Martins Silva**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:	Prof. Dr. Nilson Penha-Silva (Orientador)	[UFU]
Titular:	Prof. Dr. Antônio Vicente Mundim	[UFU]
Titular:	Profª Drª Júnia de Oliveira Costa	[IFTM]
Titular:	Profª Drª Nádia Carla Cheik	[UFU]
Titular:	Profª Drª Vanessa Neves de Oliveira	[UFJF]

Data da defesa: **15/07/2011**

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

Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**
(Orientador)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S586e Silva, Romeu Paulo Martins, 1977-
Exercício físico e saúde: 1) influência do uso de testosterona e de exercício físico sobre variáveis físicas e sanguíneas de ratos Wistar com diabetes induzido por aloxana; 2) influência de exercício de ultraduração sobre variáveis sanguíneas e salivares de atletas; 3) influência do calor sobre biomarcadores salivares de estresse e imunidade em exercício físico até a fadiga [manuscrito] / Romeu Paulo Martins Silva. – 2011.

119 f. : il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.

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

Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos- Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 612.766.1

DEDICATÓRIA

*A Deus, pela capacidade e oportunidade de chegar até aqui;
ao meu filho, João Paulo;
a minha noiva, Pâmella, pelo apoio, paciência, compreensão, confiança e companheirismo;
ao meu pai, Paulo, que mesmo distante torceu por mim;
a Rafaelita e a Maria das Dores, pelos estímulos e pela confiança depositada em mim;
aos meus irmãos e amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me mostrou o caminho correto nesta jornada e permitiu que eu enfrentasse os desafios e ultrapassasse todas as dificuldades necessárias para a concretização de mais este sonho em minha vida;

Ao meu amado e adorado filho, João Paulo, que mesmo longe sempre esteve perto, com um amor que muito me tem estimulado nesta caminhada de crescimento científico e pessoal;

A minha noiva, Pâmella, pelo amor, carinho, incentivo, paciência e apoio, mesmo nos momentos em que estive ausente, mas também por sua ajuda, desde a coleta de dados à discussão dos resultados desta tese;

À memória de meu pai, Paulo, que mesmo longe de mim se fez presente, e à Rafaelita e à Maria das Dores, pelos primeiros ensinamentos, por me incentivarem a sempre lutar pela realização de meus ideais e por jamais me deixarem sozinho nesta jornada;

À memória de minha avó, Maria Francisca, em quem sempre quero me espelhar, por me mostrar o caminho a ser seguido tanto na vida pessoal quanto na acadêmica;

Aos meus irmãos, Renata, Renato, Ronaldo e Ronan, pelo carinho e estímulo;

Ao meu irmão Renato e a um grande amigo e companheiro, Fernando, que sempre estiveram ao meu lado, dando força e ajudando a escolher o caminho a seguir, particularmente em um momento difícil de minha vida, quando pensei em desistir de tudo e eles me fizeram enxergar que mesmo tendo caído eu poderia me levantar e seguir em frente.

Aos meus sobrinhos e afilhados, pelos muitos sorrisos;

Ao meu mestre e orientador, professor Nilson Penha Silva, a quem tenho como amigo e exemplo de vida, sabedoria, ética e realização profissional, por ter acreditado em mim e no meu trabalho; por me acolher em seu laboratório no momento mais difícil desta caminhada, quando pensei em desistir; por me oferecer estímulo, força, companheirismo e ensinamentos não somente de natureza científica, para construção deste trabalho, mas também de natureza pessoal, para a construção de minha vida; por sua maneira de orientar a cada um de seus alunos, com atenção individual e por estar

sempre à disposição para esclarecer dúvidas ou rever seus trabalhos;

Aos meus sogros, Rosângela e José Ferreira, pelos ensinamentos, conselhos e incentivo nesta caminhada;

Aos amigos do laboratório, pelos ensinamentos, troca de conhecimentos e ajuda durante a realização deste trabalho, em especial a Letícia Ramos de Arvelos e Mário da Silva Garrote Filho, pelas reflexões e contribuições na compreensão e discussão dos resultados;

Aos alunos de iniciação científica, Alexandre, Rodrigo, Henrique, Fredy e o professor Cristiano Lino que ajudaram na coleta e processamentos dos resultados e modificação dos métodos do estudo;

Ao professor Antônio Vicente Mundim, por ter sido um companheiro de pesquisa, desde minha iniciação científica, passando pelo mestrado e doutorado, e pelo suporte na execução e descrição dos métodos de trabalho e também na discussão dos resultados;

Aos professores Guilherme Gularte De Agostini, Alexandre Gonçalves, Eduardo Gaspareto Haddad e Gilmar da Cunha Sousa, que me incentivaram a entrar no caminho acadêmico e científico;

À professora Maria Inês Homsí Brandenburgo, pelo seu apoio;

Aos meus ex-alunos de iniciação científica, Leonardo, Lara, Heitor, Moisés e Rodrigo, que agora já são alunos de mestrado ou doutorado, pelo incentivo ao meu aperfeiçoamento profissional a fim de continuar a ajudar outros alunos a seguirem o caminho científico e acadêmico;

Aos atletas e voluntários que se dispuseram a doar um pouco de seu sangue pela ciência, sem os quais esse trabalho não se concretizaria;

Ao Centro Universitário do Planalto de Araxá (UNIARAXA), pelas oportunidades a mim atribuídas, pela confiança, pelo estímulo à pesquisa, pela liberação dos equipamentos e laboratórios para algumas das coletas e análises deste trabalho;

Aos professores Rogério Oliveira Souza, Cristiano Regis, Nei Ahrens Haag (coordenadores de curso), Josimar Batista Ferreira (diretor de Centro) e Olinda Batista Assmar (magnífica reitora) da Universidade Federal do Acre, pela minha liberação para conclusão deste estudo;

Aos docentes do Instituto de Genética e Bioquímica, pelos ensinamentos e

construção dos saberes;

Aos demais funcionários, pelo auxílio, disponibilidade e compreensão.

APOIO

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE (UFAC)



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PLANALTO DE ARAXÁ (UNIARAXÁ)



SUMÁRIO

Abreviaturas	x
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tabelas	xiv
Apresentação.....	01
Capítulo 1 – Fundamentação teórica	03
Diabetes mellitus.....	04
Etapas iniciais da sinalização insulínica.....	05
Cascatas de fosforilação estimuladas pela insulina	08
Metabolismo protéico no diabetes.....	08
Esteróides anabolizantes	09
Exercício e imunidade	10
Biomarcadores salivares	12
Referências.....	14
 Capítulo 2 – Influence of the use of testosterone associated with physical training on some hematologic and physical parameters in older rats with alloxan-induced diabetes	 24
Abstract	25
Introduction	26
Materials and methods	28
Results	32
Discussion.....	40
Conclusions	43
References.....	44
 Capítulo 3 – Exercícios de ultraduração (Corrida de Aventura): levam ao aumento do estresse, dano muscular e induz a alterações do sistema imunológico	 48
Resumo.....	49
Introdução	51
Material e métodos.....	53
Resultados	57
Discussão	67

Conclusões	71
Referências.....	72
Capítulo 4 – Influência do calor sobre biomarcadores salivares de estresse e imunidade em exercício físico até a fadiga	77
Resumo.....	78
Introdução.....	80
Material e métodos.....	82
Resultados	87
Discussão.....	94
Conclusões	97
Referências.....	99

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AKT	Serina/treonina quinase
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância.
APCA	Associação Paulista de Corrida de Aventura
ARWS	<i>Adventure racing world series</i>
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Área de transição
ATP	Adenosina trifosfato
Ca⁺⁺	Cálcio
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CK	Creatina quinase
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP	Creatina fosfato
D	Animais diabéticos sem tratamento
Da	Dalton
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHT	5- α -diidrotestosterona
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DT	Animais diabéticos com tratamento
EAA	Esteróides anabólico-androgênicos
EDTA	Acido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima – enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Expedição Mata Atlântica
FCCA	Federação Capixaba de Corrida de Aventura
Fig	Figura

FSH	Hormônio folículo estimulante
GLUT-4	Isotipo 4 do transportador de glicose
GnRH	Hormônio de liberação das gonadotrofinas
GRB	Proteína ligante do receptor para fator de crescimento
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade - high density lipoprotein
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HSP	Proteína de choque térmico
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
ICSH	Hormônio de estimulação de células intersticiais
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IL	Interleucina
IMP	Inosina monofosfato
IRS	Substrato receptor de insulina
IRS-1	Variante 1 do substrato receptor de insulina
IRS-2	Variante 2 do substrato receptor de insulina
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade - low density lipoprotein
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
MAP-K	Quinase ativadora da atividade mitogênica
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume celular médio
mmHg	Milímetro de mercúrio
N	Animais normais sem tratamento
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NK	Células natural killer

NO	Oxido nítrico
Nos	Oxido nítrico sintase
NT	Animais normais com tratamento
PC	Ponto de controle
PC's	Pontos de controle
PFK	Fosfofrutoquinase
Pi	Fosfato inorgânico
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinase
pO₂	Pressão parcial de oxigênio
POs	Paradas obrigatórias
PROs	Pontos de passagem obrigatória
PVC	Posto de controle virtual
SBCA	Sociedade Brasileira de Corridas de Aventura
SH2	Segunda homologia ao Src
SHC	Molécula adaptadora e substrato receptor de insulina
TGA	Triacilgliceróis
TGFβ	Fator de crescimento transformador β
Th	Linfócitos T - helper

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Figura 2.1	Plasma concentrations of triacylglycerols, total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol after the maximal exercise test 36
Figura 2.2	Plasma concentrations of glucose and lactate before and after the maximal exercise test 37
Figura 2.3	Plasma levels of activities of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) after the maximal exercise test 38
CAPÍTULO 3	
Figura 3.1.	Atividades séricas da creatina quinase total (coluna esquerda) e de sua isoenzima miocárdica (coluna direita), antes e depois da competição para todos os atletas sem (A e D) e com (B e E) estratificação por sexo, e variação percentual relativa das atividades (C e F) 63
Figura 3.2	Atividade sérica da enzima alanina aminotransferase (ALT), antes e depois da competição para todos os atletas sem (A) e com estratificação por gênero (B), e variação percentual relativa das atividades da ALT (C) 64
Figura 3.3	Atividade sérica da enzima aspartato aminotransferase (AST), antes e depois da competição para todos os atletas sem (A) e com estratificação por gênero (B), e variação percentual relativa das atividades da AST (C) 65
Figura 3.4	Atividade sérica da enzima lactato desidrogenase (LDH) antes e depois da competição para todos os atletas sem (A) e com estratificação por gênero (B), e variação percentual relativa das atividades da LDH (C) 66
CAPÍTULO 4	
Figura 4.1	Concentrações salivares de IgA antes (rest), um (ex) e cinco minutos após a exaustão (post) nas temperaturas de 22 e 40 °C 89
Figura 4.2	Atividades salivares de α -amilase antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C 90
Figura 4.3	Concentrações salivares de cortisol antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C 91
Figura 4.4	Concentrações salivares de óxido nítrico antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C 92
Figura 4.5	Concentrações de proteínas totais salivares antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C 93
Figura 4.6	Concentrações de lactato sanguíneo antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C 94

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Tabela 2.1	Erythrogram of rats subjected to six weeks of regular exercise followed by maximal effort test 34
Tabela 2.2	Leucogram of rats Wistar subjected to six weeks of regular exercise followed by maximal effort test 35
Tabela 2.3	Swimming time and mass of visceral fat of rats subjected to six weeks of regular exercise followed by maximal effort test 39
CAPÍTULO 3	
Tabela 3.1	Médias $\pm$ desvios padrões e variações percentuais relativas (percentis) de variáveis bioquímicas do sangue ou saliva dos atletas durante a competição 60
Tabela 3.2	Tabela 3.2. Médias $\pm$ desvios padrões e variações percentuais relativas (percentis) das variáveis do eritrograma durante a competição 61
Tabela 3.3	Médias $\pm$ desvios padrões e variações percentuais relativas (percentis) de plaquetas e das variáveis do leucograma dos atletas durante a competição 62

APRESENTAÇÃO

O diabetes mellitus é uma doença que pode ser caracterizada por hiperglicemia crônica, decorrente tanto da deficiência pancreática na produção de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans quanto do comprometimento da ação da insulina em tecidos alvo, ou de ambos.

A permanência de um estado de hiperglicemia por longos períodos de tempo têm sido associada a várias consequências patológicas, de tal modo que a normalização da glicemia é uma meta essencial do tratamento do diabetes. Normalmente procura-se atingir essa meta com o uso de insulina ou hipoglicemiantes orais, mas a busca por intervenções capazes de mimetizar os efeitos da insulina, reduzindo sua necessidade exógena, é muito relevante no tratamento de indivíduos diabéticos.

A atividade física constitui uma intervenção moduladora da glicemia. Uma única sessão de exercícios pode aumentar a captação de glicose por estimular a mobilização de transportadores de glicose do isotipo 4 (GLUT4), contidos em vesículas intracelulares, para a membrana plasmática, segundo um mecanismo independente da ação da insulina. A prática crônica de exercícios é também capaz de aumentar a sensibilidade muscular à ação da insulina.

A atividade física e o suprimento de insulina são também importantes para o desenvolvimento do músculo esquelético em organismos jovens e a manutenção da massa muscular em adultos e idosos, o que significa que a inatividade física e o diabetes podem causar perda de massa muscular.

Entretanto, o ganho de massa muscular pode ser influenciado por outros fatores, como a testosterona, hormônio produzido pelas células de Leydig dos testículos e pela glândula adrenal. A testosterona possui efeito anabolizante e é capaz de aumentar a massa, força e resistência muscular, além de estimular o desenvolvimento de órgãos como rins, glândulas salivares e fígado.

Dentro deste contexto, é razoável admitir que a testosterona possa ter uma influência positiva sobre a preservação da massa muscular no diabetes. Entretanto,

essa é uma questão que precisa ser melhor avaliada. O **capítulo 1** desta tese apresenta uma fundamentação teórica sobre o assunto. A influência do uso de testosterona sobre ratos com diabetes induzido por estreptozotocina foi investigada nesta tese e os resultados obtidos foram descritos no **capítulo 2**.

Esta tese também trata de outro tema, a corrida de aventura, tipo de competição introduzida no Brasil no final da década de 1990. Essa competição é caracterizada como uma corrida multi-esportiva de muito longa duração, onde se utilizam obstáculos naturais (rios, montanhas, florestas e outros ambientes naturais) para a prática de atividades físicas como *mountain bike*, *rafting*, canoagem, *trekking* com orientação, técnicas verticais e natação.

A distância percorrida nesta modalidade de esporte varia de 30 a 600 km e a duração de 36 horas até 10 dias ou mais, com curtos intervalos de descanso durante toda a prova. A influência deste tipo de atividade, de longuíssima duração, sobre variáveis bioquímicas e fisiológicas precisa ser melhor compreendida. É com este intuito que o **capítulo 1** apresenta também um apanhado sobre a influência do exercício sobre o sistema imunitário e sobre biomarcadores salivares do exercício e o **capítulo 3** avalia a influência da corrida de aventura sobre diversas variáveis bioquímicas e fisiológicas.

Várias modalidades esportivas são realizadas em condições térmicas que podem influenciar no desempenho dos atletas, de tal forma que é muito importante entender a influência do exercício no calor sobre o organismo humano. É neste sentido que o **capítulo 4** procura avaliar a influência do exercício no calor sobre biomarcadores de imunidade e estresse presentes na saliva (IgA, α -amilase, cortisol, óxido nítrico e proteínas totais).

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Diabetes mellitus

O termo diabetes mellitus (DM) designa um grupo de disfunções metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica, que pode ser decorrente tanto da deficiência na produção de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans quanto do comprometimento da atuação da insulina em tecidos alvo, ou de ambos. A manutenção por longo prazo do estado hiperglicêmico tem sido associada a (1) nefropatia, que pode evoluir para insuficiência renal; (2) neuropatia periférica, podendo haver úlceras de perna, amputações e articulações de Charcot; (3) neuropatia autonômica, com consequentes sintomas cardiovasculares, genitourinários e gastrointestinais; (4) retinopatia; (5) aterosclerose, com comprometimento do sistema cerebrocardiovascular; e (6) disfunção sexual [CRIMI et al., 1995; NIGRO et al., 2006].

O DM é uma das doenças não-transmissíveis mais comuns no mundo. A doença alcançou proporções epidêmicas e no início deste século afetava mais de 170 milhões de indivíduos da população mundial, com estimativas de crescimento de quase 50% até 2010. Este crescimento será maior especialmente nos países em desenvolvimento da África, Ásia e América do Sul [ZIMMET, ALBERTI e SHAW 2001]. Em sociedades mais desenvolvidas, a prevalência do DM já alcançou aproximadamente 6%. A prevalência mundial de DM para todos os grupos etários em 2000 era de 2,8%, com estimativa inicial de atingir 4,4% da população mundial em 2030 [WILD et al., 2004], mas essa estimativa foi recentemente reavaliada para 6,4% da população mundial, em decorrência do aumento na prevalência da obesidade e do envelhecimento e urbanização da população [INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2011].

No Brasil, a população diabética foi estimada em 7,6 milhões de pessoas em 2010 [INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2011] e em 11,3 milhões em 2030 [WILD et al., 2004]. Um censo realizado entre os anos de 1986 e 1989 pelo Ministério da Saúde e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com o apoio da Sociedade Brasileira de Diabetes, demonstrou uma prevalência de diabetes de 7,6% na população entre 30 e 69 anos [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011].

As implicações sócio-econômicas das complicações médicas da doença têm um grande impacto no sistema de saúde. Os custos com o aumento de pacientes com DM

surgem não só quando o diagnóstico é estabelecido, mas pelo menos 8 anos depois, com as devastadoras complicações micro e macrovasculares decorrentes da aceleração da aterogênese. De fato, a morbidade cardiovascular em pacientes com diabetes é de duas a quatro vezes maior que em pessoas não-diabéticas [ZIMMET, ALBERTI e SHAW 2001].

O DM pode ser classificado em quatro tipos, (1) o DM tipo 1 (anteriormente denominado de DM insulino-dependente ou DM juvenil), (2) o DM tipo 2 (anteriormente denominado de DM insulino-independente ou DM adulto), (3) o DM gestacional e (4) o DM de outros tipos específicos [AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010].

O DM tipo 1 pode acometer até 10% dos indivíduos diabéticos. Ele resulta da destruição das células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas por agressão auto-imune em indivíduos geneticamente predispostos (DM tipo 1 imuno-mediado) ou por etiologias desconhecidas (DM tipo 1 idiopático) [BRESSION e VON HERRATH, 2004; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010].

O DM tipo 2 se caracteriza por resistência à insulina, podendo ocorrer sem ou com deficiência desse hormônio. A maioria destes pacientes apresenta um grau acentuado de obesidade ou possui gordura corporal localizada predominantemente na região abdominal e geralmente não necessita de insulina exógena para sobreviver [AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010]. A resistência à insulina eleva a glicemia e estimula a produção e secreção desse hormônio pelo pâncreas, resultando durante algum tempo em elevação e posteriormente em redução progressiva da insulinemia conseqüente de falência das células β pancreáticas [CHANG-CHEN, MULLUR e BERNAL-MIZRACHI, 2008].

Etapas iniciais da sinalização insulínica

A transdução de sinal da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína tetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β . O receptor atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação

da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase, levando a alteração conformacional e autofosforilação, o que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor [DEVLIN, 2010].

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila resíduos de tirosina de vários substratos. Dez substratos do receptor de insulina já foram identificados. Quatro deles pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS [WHITE, 1998]; os outros incluem Shc, Gab-1, p60dok, Cbl, JAK2 e APS [SAAD et al., 1996; PES-SIN e SALTIEL, 2000]. A fosforilação dos resíduos de tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase).

As funções do IRS-1 e do IRS-2 foram recentemente estabelecidas através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico [ARAKI et al., 1994]. O IRS-2 poderia compensar parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo de resistência à insulina sem hiperglicemia do camundongo *knockout* de IRS-1. O camundongo que não expressa o IRS-2 apresenta um fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1, hiperglicemia acentuada devida a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e falência da atividade secretora das células β acompanhada de redução significativa da massa de células β pancreáticas [WITHERS et al., 1998]. Em contraste, camundongos *knockout* para o IRS-3 e IRS-4 têm crescimento e metabolismo de glicose quase normal [FANTIN, 2000].

O receptor de insulina, além de ter fosforilação de tirosina, também pode ter fosforilação de serina, o que atenua a transdução do sinal pela diminuição da capacidade do receptor de fosforilar seus próprios resíduos de tirosina após estímulo com insulina [HOTAMISLIGIL, 1996]. Essas fosforilações inibitórias causam *feedback* negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina [CARVALHEIRA et al., 2002].

Estudos recentes indicam que a resistência à insulina induzida pela obesidade

pode ser decorrente da ativação sequencial da proteína quinase C e da quinase inibidora do fator nuclear, entretanto os detalhes dessa via de sinalização ainda não são claros [YUAN et al., 2001; KIM et al., 2001].

A ação da insulina também é atenuada por proteínas fosfatases de tirosina-fosfato, que catalisam a rápida desfosforilação do receptor de insulina e de seus substratos. Várias proteínas fosfatases de tirosina foram identificadas, dentre as quais se destaca a PTP1B. Camundongos *knockout* para PTP1B têm aumento da fosforilação de tirosina do receptor de insulina e das proteínas IRS no músculo, com consequente aumento na sensibilidade à ação da insulina [ELCHEBLY et al., 1999].

A PI 3-quinase (PI3-K) é uma enzima importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulada pela insulina [SHEPHERD, NAVE e SIDDLE, 1995; SAAD et al., 1996]. A PI-3K foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios YMXM e YXXM (onde Y= tirosina, M = metionina e X = qualquer aminoácido) fosforilados de proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3-K ativa a subunidade catalítica dessa enzima [BACKER et al., 1992].

A PI3K catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol, produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato [LIETZKE et al., 2000]. Atualmente, a PI3-K é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose [CZECH e CORVERA, 1999]. As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da aPKC (ζ e λ), porém as funções destas proteínas no transporte de glicose ainda não são bem estabelecidas [KOHN et al., 1996].

Além da ativação da PI3-K, outros sinais também são necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose. Essa via envolve a fosforilação do proto-oncogene Cbl [RIBON e SALTIEL, 1997]. Na maioria dos tecidos sensíveis à insulina, a Cbl está associada com a proteína adaptadora CAP [RIBON et al., 1998]. Após a fosforilação, o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína CrkII, que também está constitutivamente associada com a proteína C3G [BAUMANN et al., 2000; CHIANG et al., 2001]. A C3G é uma proteína trocadora de nucleotídeos

que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10, ativando-a. Uma vez ativada, a TC10 sinaliza para a translocação da proteína GLUT4 para a membrana da célula, em paralelo à ativação da via da PI3-K [CHIANG et al., 2001].

Cascatas de fosforilação estimuladas pela insulina

Da mesma forma que outros fatores de crescimento, a insulina estimula a *mitogen-activated protein* (MAP) *kinase* (MAPK). Essa via inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2 [PAEZ-ESPINOSA et al., 1999]. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras, ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da SHP2. Uma vez ativada, a Ras estimula a fosforilação de resíduos de serina de proteínas da cascata da MAPK, que leva à proliferação e diferenciação celulares [BOULTON et al., 1991].

O bloqueio farmacológico dessa via previne a ação da insulina no crescimento celular, mas não tem efeito nas ações metabólicas do hormônio [LAZAR et al., 1995]. A insulina aumenta a síntese e bloqueia a degradação de proteínas através da ativação da mTOR, controlando diretamente a translação de proteínas através da fosforilação da p70-ribossomal S6 quinase (p70rsk), que ativa a síntese ribossomal de proteínas através da fosforilação da proteína S6 [THOMAS e HALL, 1997]. A mTOR também fosforila a PHAS1, que aumenta a síntese protéica via aumento da translação de proteínas [MIRON et al., 2001].

Metabolismo protéico no diabetes

O crescimento do músculo esquelético e a manutenção da massa muscular em organismos jovens e adultos requerem um suprimento de hormônios anabolizantes (insulina) e uma quantidade adequada de atividade contrátil. A perda de massa muscular é uma característica do estado diabético e do jejum ou consequência de inatividade física prolongada.

O desenvolvimento ou a atrofia músculo-esquelética depende do balanço entre a

taxa de síntese e de degradação das proteínas intracelulares [KIMBALL, VARY e JEFFERSON, 1994].

Os efeitos anabólicos desses hormônios são reforçados por suas ações anti-catabólicas. A insulina inibe a proteólise, suprime a liberação e inibe a oxidação dos aminoácidos essenciais. Animais jovens ou humanos privados de insulina apresentam redução da massa corporal, retardo da estatura e do processo de maturação [ADAMS, 1998; LUCIANO et al., 2002].

A atividade contrátil, por outro lado, parece ser determinante fundamental da massa muscular e pode preceder os sinais endócrinos para a depleção protéica no músculo. Além disso, os músculos mantidos inativos são mais sensíveis aos sinais catabólicos [GOLDBERG, 1979; WASSERMAN e VRANIC, 1986]. O aumento do trabalho muscular é capaz de elicitar várias reações bioquímicas que são essenciais para hipertrofia muscular. A captação de aminoácidos pelo músculo esquelético é um evento precoce para iniciar a hipertrofia [CARSON, 1997]. Estudos com músculos isolados mostram que a taxa de transporte de aminoácidos está diretamente ligada à atividade contrátil [GOLDBERG, 1979; CARSON, 1997]. O treinamento físico tem a capacidade de reverter as alterações promovidas nas proteínas mitocondriais musculares em decorrência de estados de deficiência de insulina [MIDAOU, TANERED e NADEAU, 1996].

Esteróides anabolizantes

Os esteróides anabolizantes ou esteróides anabólico-androgênicos (EAA) são compostos naturais ou sintéticos semelhantes à testosterona, que exerce efeitos anabólicos e androgênicos no corpo humano [URBAN, 1999; HANDELSMAN, 2001; SHAHIDI, 2001].

A utilização dos EAA conciliada com o exercício físico tem mostrado resultados benéficos em experimentos com animais e seres humanos, como aumento da força [BASARIA et al., 2010; SRINIVAS-SHANKAR et al., 2010], diminuição do peso corporal e do tecido adiposo [DUŠKOVÁ e POSPISILOVA, 2010; SRINIVAS-SHANKAR et al., 2010],

aumento na densidade mineral óssea [MATSUMOTO, 2002] e aumento no desempenho das capacidades motoras funcionais [SRINIVAS-SHANKAR et al., 2010]. Um dos efeitos mais almejados dos EAA sobre o músculo é a hipertrofia muscular, que ocorre por aumento do número de células satélites e do tamanho do ventre muscular [ONER et al., 2008; KOVACHEVA et al., 2010]. A testosterona auxilia também na modulação da resposta imune [CHAO, VAN ALTEN e WALTER, 1994], reduzindo a ação de leucócitos e demais células de defesa [MOORADIAN, MORLEY e KORENMAN, 1987; SADER et al., 2005].

Durante o processo natural de envelhecimento ocorrem alterações no sistema muscular cardíaco e esquelético, como perda da massa muscular, com grande perda de força, juntamente com aumento da fadiga durante a realização dos exercícios físicos, redução da função sexual e cognitiva, redução do equilíbrio dinâmico e estático, decréscimo da densidade mineral óssea, aumento do risco de quedas e fraturas, perda da independência funcional, redução do dispêndio energético total e da oxidação de lipídios, aumento da massa adiposa, aumento da resistência à insulina, hipertensão arterial e doença arterial coronariana [NAIR, 2005; SANTANASTO et al., 2011]. No processo de envelhecimento há também diminuição da massa magra, juntamente com as concentrações séricas de testosterona, em decorrência da redução em sua produção nos testículos, por alteração na secreção do hormônio liberador de gonadotrofina e deficiência na estimulação da secreção de LH na glândula hipófise [NAIR, 2005; ARAUJO, TRAVISON e BHASIN, 2008; BASARIA et al., 2010]. Há também aumento das proteínas de ligação aos hormônios sexuais, com diminuição da fração livre de testosterona [MORLEY, 2003]. A combinação de EAA com o exercício físico tem sido considerada uma alternativa para retardar os prejuízos associados ao processo natural de envelhecimento [NAIR, 2000; NAIR, 2005; BASARIA et al., 2010].

Exercício e imunidade

O exercício físico pode acarretar em efeitos desejáveis e indesejáveis sobre o sistema imune, dependendo da natureza, intensidade e tempo de duração [WALSH et al., 2011].

Tem sido descrito que o exercício físico pode favorecer o desenvolvimento de infecções, como da via respiratória superiores [CARRILLO, MURPHY e CHENG et al., 2008, MALTSEVA et al., 2011].

De fato, o exercício físico pode promover alterações na resposta imune [MALTSEVA et al., 2011], que variam conforme a intensidade, tipo do treino [AKIMOTO et al., 2003; GLEDSON et al., 2011a] e até a temperatura do ambiente [CARRILLO MURPHY e EHEUNG, 2008; GILLUM et al., 2011; GLESON et al., 2011b].

Ele pode aumentar ou diminuir os níveis de imunoglobulinas plasmáticas [PACQUE et al., 2007; ALLGROVE et al., 2008], dependendo da intensidade e duração do exercício, com aumento em exercícios de curta duração e alta intensidade [ALLGROVE et al., 2008], mas diminuição em exercícios de longa duração [MAZZEO, 2005; PACQUE et al., 2007].

De acordo com a intensidade e duração do exercício há aumento na quantidade de leucócitos [LANDMANN, 1992; KRATZ et al., 2006; GHANBARI-NIAKI et al., 2010] e de neutrófilos [ROBSON et al., 1999; PEAKE, 2002], mas diminuição na quantidade de linfócitos [MCCARTHY e DALE, 1988; SHEK et al., 1995; KRATZ et al., 2006] e de monócitos [WU et al., 2004; KRATZ et al., 2006]. Essas alterações foram associadas à descarga de catecolaminas durante o exercício [RISOY et al., 2003]. De fato, os próprios níveis de receptores β -2-adrenérgicos em linfócitos de pacientes saudáveis e mesmo de pacientes com insuficiência cardíaca aumentaram após a realização de um protocolo de exercício em uma esteira [MAISEL et al., 1990]. As alterações hematológicas observadas também foram associadas a elevação nos níveis de cortisol [NIEMAN e NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994], promovida pelo aumento na tensão de cisalhamento em consequência das alterações hemodinâmicas observadas durante o exercício [MCCARTHY et al., 1992; KRUEGER e MOOREN, 2007], e a resposta inflamatória decorrente de dano tecidual [WU et al., 2004, KRATZ et al., 2006].

Biomarcadores salivares

Vários componentes da saliva, como α -amilase, IgA, cortisol, óxido nítrico e proteínas totais têm sido utilizados para avaliar as alterações fisiológicas decorrentes do exercício [BORTOLINI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010]. A saliva é produzida pelas glândulas parótidas, submandibular, sublingual e por pequenas glândulas da região da boca [VINING, MCGINLEY e MAKSUTIS, 1983], sob controle autônomo de estímulos simpático e parassimpático [EMMELIN, 1987]. O aumento da quantidade e fluidez da saliva seria promovido por estímulo parassimpático vasodilatador, enquanto a diminuição de volume seria decorrente de ação simpática vasoconstritora [DENNIS et al., 1978].

O exercício físico promove alterações nos níveis salivares de IgA [GLEESON et al., 2011], proteínas totais, α -amilase [BORTOLINI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010], óxido nítrico [DI LUIGI et al., 2008] e cortisol [GREIG et al., 2007].

Diminuições na concentração absoluta de IgA salivar têm sido mostradas em praticantes de diferentes modalidades esportivas, como esquiadores de elite [TIOILLIER et al., 2005], nadadores [FRANCIS et al., 2005], maratonistas [PETERS, SHAIK e KLEINVELDT et al., 2010] e ciclistas [SLIVKA et al., 2010]. Essa queda nos níveis de IgA na saliva seria decorrente das alterações promovidas pelo exercício no sistema imunitário [MCKUNE et al., 2005; GLEESON et al., 2011b].

O prejuízo à defesa imunológica nas vias respiratórias superiores estaria associado à diminuição da IgA salivar em decorrência de exercícios físicos de alta intensidade e/ou longa duração, mas não à prática regular de exercícios moderados, que não prejudicam o sistema imunológico e, pelo contrário, vão promover melhora na resposta imune [BUYUKYAZI et al., 2004; SARI-SARRAF et al., 2008].

Embora a IgA venha sendo preferida como biomarcador salivar de efeitos do exercício, as outras imunoglobulinas (IgG e IgM) também têm sido avaliadas [GLEESON, CRIPPS e CLANCY, 1995; NIEMAN et al., 2002; GLEESON et al., 2011a]

O exercício também pode ser monitorado pela dosagem de proteínas totais sali-

vares e de α -amilase [BORTOLINI et al., 2009], cujos níveis aumentam com o aumento na intensidade e duração do exercício [OLIVEIRA et al., 2010], em decorrência de estímulo simpático adrenérgico [DAWES, 1981; SOLTOFF e HEDDEN., 2010]. O incremento de carga em cicloergômetro promove elevações nas concentrações de proteínas totais e na atividade da α -amilase em ciclistas [OLIVEIRA et al., 2010] e em jogadores de basquete [BORTOLINI et al., 2009] de forma semelhante ao aumento nos níveis de lactato no sangue.

O óxido nítrico (NO) é um importante regulador hemodinâmico e metabólico que está envolvido em diversos processos fisiológicos, tais como relaxamento de musculatura lisa, neurotransmissão, agregação plaquetária e defesa contra doenças infecciosas (virais), tumores, auto-imunidade e degeneração crônica [BOGDAN, 2001; L'HIRONDEL et al., 2007; FILAIRE et al., 2010]. Os níveis de NO aumentam no sangue e na saliva durante exercício físico de baixa [ZAMBRANO et al., 2009] ou alta intensidade [PANOSSIAN et al., 1999; JACOBS et al., 2009], tanto de curta [CAMPBELL et al., 2011] quanto de longa duração [GONZÁLEZ et al., 2008] .

O aumento nos níveis de NO pelo exercício físico seria decorrente do (1) atrito de cisalhamento vascular, em função do aumento do fluxo e da viscosidade do sangue, o que eleva os níveis de Ca^{++} e promove liberação de NO no endotélio vascular [SEGAL, 1994], e/ou (2) da liberação de acetilcolina da junção neuromuscular e sua difusão para o endotélio vascular, onde ela ativaria receptores muscarínicos e promoveria liberação de NO [KINGWELL, 2000]. O NO então se difunde para as subjunções das células vasculares da musculatura lisa, onde ativa a guanilato ciclase, promovendo vasodilatação [SEGAL, 1994]. De fato, a força de cisalhamento é aumentada nos vasos durante o exercício físico em humanos [TAYLOR et al., 2002].

Referências

ADAMS GR. Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increased loading. **Exercise and Sport Sciences Reviews**. 26: 31-60, 1998.

AKIMOTO T, KUMAI Y, AKAMA T, HAYASHI E, MURAKAMI H, SOMA R, KUNO S, KONO I. Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. **British Journal of Sports Medicine**. 37(1): 76-79, 2003.

ALLGROVE JE, GOMES E, HOUGH J, GLEESON M. Effects of exercise intensity on salivary antimicrobial proteins and markers of stress in active men. **Journal of Sports Sciences**. 26(6): 653-661, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. 33(S1): S62-S69, 2010.

ARAKI E, LIPES MA, PATTI ME, BRUNING JC, HAAG B 3RD, JOHNSON RS. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**. 372: 186-190, 1994.

ARAUJO AB, TRAVISON TG, BHASIN S. Association between testosterone and estradiol and age-related decline in physical function in a diverse sample of men. **Journal of the American Geriatrics Society**. 56: 2000-2008, 2008.

BACKER JM, MYERS MG JR, SHOELSON SE, CHIN DJ, SUN XJ, MIRALPEIX M. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **The EMBO Journal**. 11: 3469-3479, 1992.

BASARIA S, COVIELLO AD, TRAVISON TG, STORER TW, FARWELL WR, JETTE AM, EDER R, TENNSTEDT S, ULLOOR J, ZHANG A, CHOONG K, LAKSHMAN KM, MAZER NA, MICIEK R, KRASNOFF J, ELM I A, KNAPP PE, BROOKS B, APPLEMAN E, AGGARWAL S, BHASIN G, HEDE-BRIERLEY L, BHATIA A, COLLINS L, LEBRASSEUR N, FIORE LD, BHASIN S. Adverse events associated with testosterone administration. **The New England Journal of Medicine**. 363(2): 109-122, 2010.

BAUMANN CA, RIBON V, KANZAKI M, THURMOND DC, MORA S, SHIGEMATSU S. CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**. 407: 202-207, 2000.

BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**. 2(10): 907-916, 2001.

BORTOLINI MJS, AGOSTINI G, REIS IT, SILVA RPM, LAMOUNIER RPMS, ESPINDOLA FS. Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. **Research Quarter-**

ly for Exercise and Sport. 80(3): 604-610, 2009.

BOULTON TG, NYE SH, ROBBINS DJ, IP NY, RADZIEJEWSKA E, MORGENBESSER SD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosinephosphorylated in response to insulin and NGF. **Cell**. 65: 663-667, 1991.

BRESSON D, VON HERRATH M. Mechanisms underlying type I diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 3: 321-327, 2004.

BUYUKYAZI G, KUTUKCULER N, KUTLU N, GENEL F, KARADENIZ G, OZKUTUK N. Differences in the cellular and humoral immune system between middle-aged men with different intensity and duration of physically training. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**. 44(2): 207-214, 2004.

CAMPBELL R, FISHER JP, SHARMAN JE, MCDONNELL BJ, FRENNEAUX MP. Contribution of nitric oxide to the blood pressure and arterial responses to exercise in humans. **Journal of Human Hypertension**. 25(4): 262-270, 2011.

CARRILLO AE, MURPHY RJ, CHEUNG SS. Vitamin C supplementation and salivary immune function following exercise-heat stress. **International Journal of Sports Physiology and Performance**. 4: 516-530, 2008.

CARSON, J.A. The regulation of gene expression in hypertrophying skeletal muscle. **Exercise and Sport Sciences Reviews**. 25: 301-320, 1997.

CARVALHEIRA JB, RIBEIRO EB BGR, TELLES MM, VELLOSO LA, GONTIJO JA. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. **Diabetes**. 51: A41. 2002.

CHANG-CHEN, KJ; MULLUR, R; BERNAL-MIZRACHI, E. β -cell failure as a complication of diabetes. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**. 9: 329–343, 2008.

CHAO TC, VAN ALTEN PJ, WALTER R J. Steroid sex hormone and macrophage function: modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. **American Journal of Reproductive Immunology**. 32: 43-52, 1994.

CHIANG SH, BAUMANN CA, KANZAKI M, THURMOND DC, WATSON RT, NEUDAUER CL. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature**. 410: 944-948, 2001.

CRIMI S, CIPOLLI D, INFANTONE E, INFANTONE L, LUNETTA M. Microalbuminuria and severity of diabetic retinopathy in type 1 diabetic patients: association and relationship with some risk factors. **Diabetes & Metabolism**. 21: 440-445, 1995.

CZECH MP, CORVERA S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport.

The Journal of Biological Chemistry. 274: 1865-1868, 1999.

DAWES C. The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. **The Journal of Physiology.** 320: 139-1448, 1981.

DEVLIN TM. **Textbook of Biochemistry.** 7th ed. New York, Wiley-Liss, 2010.

DI LUIGI L, BALDARI C, SGRÒ P, EMERENZIANI GP, GALLOTTA MC, BIANCHINI S, ROMANELLI F, PIGOZZI F, LENZI A, GUIDETTI L. The type 5 phosphodiesterase inhibitor tadalafil influences salivary cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulphate responses to maximal exercise in healthy men. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** 93(9): 3510-3514, 2008.

DUŠKOVÁ M, POSPÍŠILOVÁ H. The role of non-aromatizable testosterone metabolite in metabolic pathways. **Physiological Research** . 60(2): 253-61, 2011

ELCHEBLY M, PAYETTE P, MICHALISZYN E, CROMLISH W, COLLINS S, LOY AL. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science.** 283: 1544-1548, 1999.

EMMELIN N. Nerve interactions in salivary glands. **Journal of Dental Research.** 66: 509-517, 1997.

FANTIN VR, WANG Q, LIENHARD GE, KELLER SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism.** 278: E127-133, 2000.

FILAIRE E, MASSART A, PORTIER H, ROUVEIX M, ROSADO F, BAGE AS, GOBERT M, DURAND D. Effect of 6 Weeks of n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress in Judo athletes. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism.** 20(6): 496-506, 2010.

FRANCIS JL, GLEESON M, PYNE DB, CALLISTER R, CLANCY RL. Variation of salivary immunoglobulins in exercising and sedentary populations. **Medicine & Science in Sports & Exercise.** 37(4): 571-578, 2005.

GHANBARI-NAKI A, SAGHEBJOO M, RASHID-LAMIR A, FATHI R, KRAEMER RR. Acute circuit-resistance exercise increases expression of lymphocyte agouti-related protein in young women. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.).** 235(3):326-334, 2010.

GILLUM TL, KUENNEN MR, SCHNEIDER S, MOSELEY P. A review of sex differences in immune function after aerobic exercise. **Exercise Immunology Review.** 17: 104-121, 2011.

GLEESON M, BISHOP N, OLIVEIRA M, MCCAULEY T, TAULER P. Sex differences in immune variables and respiratory infection incidence in an athletic population. **Exercise Immunology Review**. 17: 122-135, 2011a.

GLEESON M, CRIPPS AW, CLANCY RL. Modifiers of the human mucosal immune system. **Immunology & Cell Biology**. 73(5): 397-404, 1995.

GLEESON M, BISHOP N, OLIVEIRA M, MCCAULEY T, TAULER P, MUHAMAD AS. Respiratory infection risk in athletes: association with antigen-stimulated IL-10 production and salivary IgA secretion. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports - Journal**. 2011b Mar 8. doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01272.x. [Epub ahead of print].

GOLDBERG A. Influence of insulin and contractile activity on muscle size and protein balance. **Diabetes**. 28: 18-24, 1979.

GONZÁLEZ D, MARQUINA R, RONDÓN N, RODRIGUEZ-MALAVAR AJ, REYES R. Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. **Research in Sports Medicine**. 16(2): 128-137, 2008.

GREIG M MARCHANT D, LOVELL R, CLOUGH P, MCNAUGHTON L. A continuous mental task decreases the physiological response to soccer-specific intermittent exercise. **British Journal of Sports Medicine**. 41(12): 908-913, 2007.

HANDELSMAN DJ. Androgen action and pharmacologic uses. In: De Groot LJ, Jameson JL, editors. **Endocrinology**. Philadelphia. 232-242, 2001.

HOTAMISLIGIL GS, PERALDI P, BUDAVARI A, ELLIS R, WHITE MF, SPIEGELMAN BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. **Science**. 271: 665-668, 1996.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes atlas. Disponível em: <<http://www.eatlas.idf.org>> acesso em: 18 fev, 2011.

JACOBS PL, GOLDSTEIN ER, BLACKBURN W, OREM I, HUGHES JJ. Glycine propionyl-L-carnitine produces enhanced anaerobic work capacity with reduced lactate accumulation in resistance trained males. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. 2;6-9, 2009.

KIM JK, KIM YJ, FILLMORE JJ, CHEN Y, MOORE I, LEE J. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. **THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION**. 108: 437-446, 2001.

KIMBALL SR, VARY TC, JEFFERSON LS. Regulation of protein synthesis by insulin. **Annual Review of Physiology**. 56: 321-348, 1994.

KINGWELL BA. Nitric Oxid-mediated metabolic regulation during exercise: effects of trainig in heath and cardiovascular disease. **The FASEB Journal**. 14: 1685-1696, 2000.

KOHN AD, SUMMERS SA, BIRNBAUM MJ, ROTH RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. **The Journal of Biological Chemistry**. 271: 31372-31378, 1996.

KOVACHEVA EL, HIKIM AP, SHEN R, SINHA I, SINHA-HIKIM I. Testosterone Supplementation Reverses Sarcopenia in Aging through Regulation of Myostatin, c-Jun NH2-Terminal Kinase, Notch, and Akt Signaling Pathways. **Endocrinology**. 151(2): 628-638, 2010.

KRATZ A, WOOD MJ, SIEGEL AJ, HIERS JR, VAN COTT EM. Effects of marathon running on platelet activation markers: direct evidence for in vivo platelet activation. **American Journal of Clinical Pathology**. 125(2): 296-300, 2006.

KRUEGER K AND MOOREN FC. T cell homing and exercise. **Exercise Immunology Review** 13: 37- 54, 2007.

LANDMANN R. Beta-adrenergicreceptors in human leukocyte subpopulations. **European Journal of Clinical Nutrition**. 1: 30 -36. 1992.

LAZAR DF, WIESE RJ, BRADY MJ, MASTICK CC, WATERS SB, YAMAUCHI K. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. **The Journal of Biological Chemistry**. 270: 20801-20807. 1995.

L'HIRONDEL M, SOUBEYRAND E, L'HIRONDEL JL, ROUSSELOT P, LETELLIER P, COMPERE JF, BENATEAU H. Salivary nitrates. New perspectives concerning the physiological function of saliva. **Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale**. 108(2): 115-119, 2007.

LIETZKE SE, BOSE S, CRONIN T, KLARLUND J, CHAWLA A, CZECH MP. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. **Molecular Cell**. 6: 385-394. 2000.

LUCIANO E, CARNEIRO EM, CARVALHO CR, CARVALHEIRA JB, PERES SB, REIS MA, SAAD MJ, BOSCHERO AC, VELLOSO LA. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**. 147(1): 149-157, 2002.

MAISEL AS, HARRIS T, REARDEN CA, MICHEL MC. Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. Alterations in normal individuals and patients with congestive heart failure. **Circulation**. 82(6): 2003-2010, 1990.

MALTSEVA DV, SAKHAROV DA, TONEVITSKY EA, NORTHOFF H, TONEVITSKY AG. Killer cell immunoglobulin-like receptors and exercise. **Exercise Immunology Review**. 17: 150-163, 2011.

MATSUMOTO AM. Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**. 57(2): 76-99, 2002.

MAZZEO RS. Altitude, exercise and immune function. **Exercise Immunology Review**. 11:6-16, 2005.

MCCARTHY DA, DALE MM. The leucocytosis of exercise. A review and model. **Sports Medicine**. 6: 333-363, 1988.

MCCARTHY DA, MACDONALD I, GRANT M, MARBUT M, WATLING M, NICHOLSON S, DEEKS JJ, WADE AJ AND PERRY JD. Studies on the immediate and delayed leucocytosis elicited by brief (30-min) strenuous exercise. **European Journal of Applied Physiology**. 64: 513-517, 1992.

MCKUNE AJ, SMITH LL, SEMPLE SJ, WADEE AA. Influence of ultra-endurance exercise on immunoglobulin isotypes and subclasses. **British Journal of Sports Medicine**. 39(9): 665-670, 2005.

MIDAOUY AE, TANCREDE G, NADEAU A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**. 45: 810-816, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Anuário Estatístico de Saúde do Brasil 2001**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001>> acesso em: 22 Fev 2011.

MIRON M, VERDU J, LACHANCE PE, BIRNBAUM MJ, LASKO PF, SONENBERG N. The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signaling and cell growth in *Drosophila*. **Nature Cell Biology**. 3: 596-601, 2001.

MOORADIAN AD, MORLEY JE, KORENMAN SG. Biological actions of androgens. **Endocrine Reviews**. 8: 1-28, 1987.

MORLEY JE. Hormones and the aging process. **Journal of the American Geriatrics Society**. 51(7): 333-337, 2003

NAIR KS. Age-related changes in muscle. **Mayo Clinic Proceedings**. 75: 14-18, 2000.

NAIR, K. S. Aging muscle. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 81: 953-963, 2005.

NIEMAN DC, NEHLSSEN-CANNARELLA SL. The immune response to exercise. **Semin Hematol.** 31: 166-179, 1994.

NIEMAN DC, HENSON DA, FAGOAGA OR, NEHLSSEN-CANNARELLA SL, SONNENFELD G, UTTER AC. Influence of skinfold sum and peak VO(2) on immune function in children. **International Journal of Obesity.** 26(6): 822-829, 2002.

NIGRO J, OSMAN N, DART AM, LITTLE PJ. Insulin Resistance and Atherosclerosis. **Endocrine Reviews.** 27: 242-259, 2006.

OLIVEIRA V N, BESSA A, LAMOUNIER R P M S, SANTANA M G, MELLO M T, ESPINDOLA F S. Changes in the Salivary Biomarkers Induced by an Eff ort Test. **International Journal Sports Medicine.** 31(6): 377-381, 2010.

ONER J, ONER H, SAHIN Z, DEMIR R, USTÜNEL I. Melatonin is as effective as testosterone in the prevention of soleus muscle atrophy induced by castration in rats. **Anatomical Record (Hoboken).** 291(4): 448-455, 2008.

PACQUE PF, BOOTH CK, BALL MJ, DWYER DB. The effect of an ultra-endurance running race on mucosal and humoral immune function. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness.** 47(4): 496-501, 2007.

PAEZ-ESPINOSA EV, ROCHA EM, VELLOSO LA, BOSCHERO AC, SAAD MJ. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. **Molecular and Cellular Endocrinology.** 156: 121-129, 1999

PANOSSIAN AG, OGANESSIAN AS, AMBARTSUMIAN M, GABRIELIAN ES, WAGNER H, WIKMAN G. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. **Phytomedicine.** 6: 17-26, 1999.

PEAKE JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. **Exercise Immunology Review.** 8: 49-100, 2002.

PESSIN JE, SALTIEL AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation.** 106: 165-169, 2000.

PETERS EM, SHAIK J, KLEINVELDT N. Upper respiratory tract infection symptoms in ultramarathon runners not related to immunoglobulin status. **Clinical Journal of Sport Medicine.** 20(1): 39-46, 2010.

RIBON V, HERRERA R, KAY BK, SALTIEL AR. A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain- containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. **The Journal of Biological Chemistry.** 273: 4073-4080. 1998.

RIBON V, SALTIEL AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical Journal**. 324: 839-845, 1997.

RISOY BA, RAASTAD T, HALLÉN J, LAPPEGÅRD KT, BAEVERFJORD K, KRAVDAL A, SIEBKE EM, BENESTAD HB. Delayed leukocytosis after hard strength and endurance exercise: aspects of regulatory mechanisms. **BMC Physiology**. 11; 3-14, 2003.

ROBSON PJ, BLANNIN AK, WALSH NP, CASTELL LM, GLEESON M. Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. **International Journal Sports Medicine**. 20: 128-135, 1999.

SAAD MJ, CARVALHO CR, THIRONE AC, VELLOSO LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **The Journal of Biological Chemistry**. 271: 22100-22104, 1996.

SADER MA, MCGRATH KC, HILL MD, BRADSTOCK KF, JIMENEZ M, HANDELSMAN DJ, CELERMAJER DS, DEATH AK. Androgen receptor gene expression in leucocytes is hormonally regulated: implications for gender differences in disease pathogenesis. **Clinical Endocrinology**. 62(1): 56-63, 2005.

SANTANASTO AJ, GLYNN NW, NEWMAN MA, TAYLOR CA, BROOKS MM, GOODPASTER BH, NEWMAN AB. Impact of weight loss on physical function with changes in strength, muscle mass, and muscle fat infiltration in overweight to moderately obese older adults: a randomized clinical trial. **Journal of Obesity**. 2011; 2011. pii: 516576, 2010.

SARI-SARRAF V, REILLY T, DORAN D, ATKINSON G. Effects of repeated bouts of soccer-specific intermittent exercise on salivary IgA. **International Journal Sports Medicine**. 29(5): 366-371, 2008.

SEGAL S. Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. **Hypertension**. 23: 1113-1120, 1994.

SHAHIDI NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**. 23: 1355-1390, 2001.

SHEK PN, SABISTON BH, BUGUET A, RADOMSKI MW. Strenuous exercise and immunological changes: a multiple-time-point analysis of leukocyte subsets, CD4/CD8 ratio, immunoglobulin production and NK cell response. **International Journal Sports Medicine**. 16: 466-474, 1995.

SHEPHERD PR, NAVE BT, SIDDLE K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. **Biochemical Journal**. 305: 25-28, 1995.

SLIVKA DR, HAILES WS, CUDDY JS, RUBY BC. Effects of 21 days of intensified training on markers of overtraining. **The Journal of Strength & Conditioning Research**. 24(10): 2604-2612, 2010.

SOLTOFF SP, HEDDEN L. Isoproterenol and cAMP block ERK phosphorylation and enhance $[Ca^{2+}]_i$ increases and oxygen consumption by muscarinic receptor stimulation in rat parotid and submandibular acinar cells. **The Journal of Biological Chemistry**. 285(18): 13337-13348, 2010.

SRINIVAS-SHANKAR U, ROBERTS SA, CONNOLLY MJ, O'CONNELL MD, ADAMS JE, OLDHAM JA, WU FC. Effects of testosterone on muscle strength, physical function, body composition, and quality of life in intermediate-frail and frail elderly men: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 95(2): 639-650, 2010.

TAYLOR CA, CHENG CP, ESPINOSA LA, TANG BT, PARKER D, HERFKENS RJ. In vivo quantification of blood flow and wall shear stress in the human abdominal aorta during lower limb exercise. **Annals of Biomedical Engineering**. 30: 402-408, 2002.

THOMAS G, HALL MN. TOR signaling and control of cell growth. **Current Opinion in Cell Biology**. 9: 782-787, 1997.

TIOILLIER E, SCHMITT L, BURNAT P, FOUILLOT JP, ROBACH P, FILAIRE E, GUEZENNEC C, RICHALET JP. Living high-training low altitude training: effects on mucosal immunity. **European Journal of Applied Physiology**. 94(3): 298-304, 2005.

URBAN RJ. Effects of testosterone and growth hormone on muscle function. **The Journal of laboratory and clinical medicine**. 134: 7-10, 1999.

VINING RF, MCGINLEY RA, MAKSUJTIS JJ. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. **Annals of Clinical Biochemistry**. 20(6): 329-335, 1983.

WALSH NP, GLEESON M, SHEPHARD RJ, GLEESON M, WOODS JA, BISHOP NC, FLESHNER M, GREEN C, PEDERSEN BK, HOFFMAN-GOETZ L, ROGERS CJ, NORTHOFF H, ABBASI A, SIMON P. POSITION STATEMENT. Part one: Immune function and exercise. **Exercise Immunology Review**. 17: 6-63, 2011.

WASSERMAN DH, VRANIC M. Interaction between insulin and counterregulatory hormones in control of substrate utilization in health and diabetes during exercise. Diabetes: **Metabolism Reviews**. 1(4): 359-384, 1986.

WHITE MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 182: 3-11, 1998.

WILD S, ROGLIC G, GREEN A, SICREE R, KING H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. 27: 1047-1053, 2004.

WITHERS DJ, GUTIERREZ JS, TOWERY H, BURKS DJ, REN JM, PREVIS S. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**. 391: 900-9004. 1998.

WU HJ, CHEN KT, SHEE BW, CHANG HC, HUANG YJ, YANG RS. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. **World Journal of Gastroenterology**. 10: 2711-2714, 2004.

YUAN M, KONSTANTOPOULOS N, LEE J, HANSEN L, LI ZW, KARIN M. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . **Science**. 293: 1673-1677. 2001.

ZAMBRANO JC, MARQUINA R, SULBARÁN N, RODRÍQUEZ-MALAVAR AJ. REYES RA. Aerobic exercise reduced oxidative stress in saliva of persons with Down syndrome. **Res Sports Med**. 17(3): 195-203. 2009.

ZIMMET P, ALBERTI K.GMM, SHAW J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**. 414: 782-787, 2001.

CAPÍTULO 2

**INFLUENCE OF THE USE OF TESTOSTERONE ASSOCIATED WITH PHYSICAL TRAINING
ON SOME HEMATOLOGIC AND PHYSICAL PARAMETERS IN OLDER RATS WITH ALLOX-
AN-INDUCED DIABETES**

Influence of the use of testosterone associated with physical training on some hematologic and physical parameters in older rats with alloxan-induced diabetes

Romeu Paulo Martins Silva^{a,b}, Rodrigo Otávio Santos^c, Nelson Eurípedes Matildes Jr.^c, Antonio Vicente Mundim^a, Mario da Silva Garrote-Filho^a, Nilson Penha-Silva^{a,*}

^aInstitute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^bFederal University of Acre, Cruzeiro do Sul, AC, Brazil

^cUniversitary Center of the Araxá Plateau, Araxá, MG, Brazil

*Correspondence: N. Penha-Silva, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

Abstract

Elderly rats (32) were divided into four groups: normal (N), treated normal (NT), diabetic (D) and treated diabetic (DT). They were submitted to 20 sessions of swimming with overload (5% body weight), 40 min/day for four weeks. The NT and DT groups received application of testosterone twice a week. At the end of the sessions, the animals were subjected to swimming until exhaustion and then killed for removal of blood and visceral fat. We evaluated maximum swim time, weight of visceral fat, erythrogram, leukogram, lipidogram and serum levels of glucose, lactate, aspartate aminotransferase and creatine kinase. The results were compared using one-way ANOVA followed by the post hoc Tukey test. In elderly diabetic rats, the use of anabolic associated with physical training in older rats resulted in improvement in erythrogram, lipidogram and physical performance for high-intensity aerobic exercise. However, it was related to changes in leukocyte count, probably associated with inflammation.

Keywords: Anabolic steroid, aging, diabetes, physical training

Introduction

Diabetes mellitus is characterized by a deficiency in the production or action of insulin, or both, resulting in increased blood glucose in untreated [1].

Diabetes can be induced in experimental animals by chemical substances such as alloxan or streptozotocin. These substances cause irreversible lesions in the pancreatic cells producing insulin. This causes a large reduction in the production of insulin, which results in diabetes [2].

The deficiency of insulin causes loss of muscle mass due to exacerbation of the decline of proteolysis and protein anabolism.

Besides insulin, protein anabolism is also stimulated by testosterone, androgen steroid hormone produced by the testes and the adrenal [3]. Testosterone promotes increased mass [4] and muscle strength [5,6,7].

There is evidence that treatment with these compounds can improve the resistance of skeletal muscle against fatigue, which increases the tolerance of experimental animals to physical activity [8].

The intense physical exercise can alter the concentration of blood cells and increase the use of glycogen, resulting in glucose fall [9,10,11,12] and increased production of lactic acid.

Testosterone can also assist in modulating the body's immune response [13], by reducing the activity of leukocytes and other cells of defense [14].

Physical exercise causes numerous physiological and metabolic adjustments in the immediate or long term so that the body can supply a higher energy demand and to remain in homeostasis [15,16].

Although it is known that anabolic steroids can increase the tolerance to physical activity [8], the effects of the combination of many synthetic anabolic steroids with the exercise still need to be better known [17].

The purpose of this study was to analyze the effects of anabolic steroids on physical, haematological and biochemical variables in diabetic rats under aerobic physical training.

Materials and methods

The study was conducted in accordance with the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) [18].

Induction of diabetes by alloxan

Induction of experimental diabetes mellitus followed the protocols described in literature [19,20]. After 24 hours of fasting, animals received intravenous injections (tail vein) of alloxan monohydrate (Sigma, St Louis, MO, USA) in 0.01 M citrate buffer, pH 4.5 (35 mg/kg body weight). The control rats underwent similar handling but only with injection of a citrate buffer solution. Two weeks after that treatment, rats that had levels of fasting glucose greater than or equal to 126 mg/dl were considered diabetic and used in the study [1].

Experimental groups

For this study we used 32 male albino rats (12 months) from Wistar race (*Rattus norvegicus*), distributed randomly into four groups (eight rats in each): normal animals without treatment (N), untreated diabetic animals (D) normal animals with treatment (NT) and diabetic animals with treatment (DT).

Containment and nutrition

The animals were kept in collective cages (100x50x30 cm) with an average of 3 rats per cage. The temperature inside the chamber of the vivarium was maintained between 22-25 °C in a room with controlled photoperiod set to 12 h of light and 12 h of darkness. All animals were fed with standard balanced diet and water "ad libitum".

Adaptation and physical training

The animals were subjected to an adjustment period of two weeks. During this period, the animals were subjected to physical exercise with initial duration of 10 min. Every three days the duration of exercise increased by 10 min until reach 40 min at the end of two weeks, with rest on Saturdays and Sundays.

After the adjustment period, the animals maintained the 40 minutes of physical exercise for six weeks, Monday to Friday, between 2 and 5 PM. This period of training was higher than achieved in other studies. The exercises consisted of sessions of swimming with moderate intensity, with 5% body weight tied to the tail. The animals swam in an adapted tank with depth of 48 cm and water temperature maintained between 30 and 36 °C [21].

Treatment with anabolic

During the six weeks of physical training, the animals of the NT and DT groups received intramuscular injections of the mixture of esters of testosterone (testosterone propionate, 30 mg; testosterone phenyl propionate, 60 mg; testosterone isocaproate, 60 mg; testosterone decanoate, 100 mg; benzyl alcohol, 0.1 ml; and peanut oil, sufficient quantity to 1 ml) (Durateston[™], Organon, Brazil), with syringes of 1 ml (15 mg/kg body weight) twice a week (on Tuesdays and Fridays at 4h30min PM).

Animals not treated with the anabolic (groups N and D) received intramuscular injections of peanut oil [22].

Test of maximum effort and sacrifice of animals

At the end of six weeks of training, the animals were subjected to intense physical exercise until exhaustion. It was considered that the exhaustion was achieved when the animal could not keep their noses out of the water for more than 10 s. Once the exhaustion was reached, the animals were removed from the water and placed on

a bench. Body and tail were carefully dried with sterile paper towels. After the last session of exercise until exhaustion, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine and sacrificed by decapitation in guillotine.

Collection of blood samples

The blood samples were taken at the end of six weeks of treatment. Before and after the exhaustion test, samples of 25 µl of blood were transferred from the tail of each animal, using heparinized capillary glass, directly into vials containing 50 µl of 1% sodium fluoride for inhibition of glycolytic activity. These samples were used for determination of glucose and lactate. After the exhaustion test, two blood aliquots were collected by cardiac puncture. The first sample (1 ml), collected in tubes containing K₃EDTA as anticoagulant, was used to perform the hematologic analyses. The second sample (3 ml), collected in tubes without anticoagulant, was centrifuged at 720 xg and the serum was transferred to sealed vials and stored under refrigeration until the time of biochemical analysis.

Dosage of glucose and lactate

The blood glucose was determined using the Accu-Chek apparatus (Roche, São Paulo, SP, Brazil). The blood lactate was analyzed by electro-enzymatic method in an automatic analyzer (YSI 1500 Sport L-Lactate, USI, Yellow Springs, Ohio, USA).

Erythrogram

The erythrogram, including the determination of the erythrocyte indices [mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)], were performed in automated cell counter ABC Vet (ABX Diagnostics, Montpellier, France) using card specific to rats.

Leukogram

The leukometry was also carried out in the automatic cell counter ABC Vet (ABX Diagnostics, Montpellier, France). The identification and differential counting of leukocyte were performed with preparations stained by the method May-Grünwald-Giemsa in optical microscope.

Lipidogram and determination of serum activities of AST and CK

The activities of creatine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST) and levels of total cholesterol, triacylglycerols (TAG) and cholesterol of high density lipoprotein (HDL-C) were determined by automated methods, using specific commercial kits (Labtest) in automatic multichannel analyzer (ChemWell, USA) previously calibrated and measured with calipers (Calibra 1H) and control serum (Qualitrol 1H). The cholesterol of lipoprotein, low-(LDL-C) was calculated using the equation $LDL-C = \text{total cholesterol} - (HDL + TAG / 5)$ [23].

Statistical analysis

The results between the different groups were compared with use of ANOVA, with post hoc Tukey test, and were considered significantly different when $P < 0.05$. The tests were conducted using the application GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Table 2.1 presents the average values obtained in the erythrogram of different groups. The concentration of hemoglobin, the red cell count and hematocrit values were higher in treated groups (NT and DT) in relation to non-treated groups (N and D). But there was no difference in these parameters between diabetic and normal groups in the absence and in presence of treatment with anabolic. The mean corpuscular volume (MCV) was also higher in treated groups (NT and DT) than in groups that were not treated with testosterone (N and D), being higher in DT group than in NT. The mean corpuscular hemoglobin (MCH) was higher in treated groups (NT and DT) than in group N. The mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) was higher in the group of treated normal rats than in the other groups.

Table 2.2 presents the results of leukocyte counts in different groups. The treated groups showed higher values of leukocytes in relation to the untreated animals. But no difference was observed between diabetic and normal groups in both the absence and in presence of treatment with anabolic. In relation to total neutrophils, the DT group had the highest count among all groups studied. The situation was reversed in the count of lymphocytes, since it was lower in the DT group compared with group N. The values of band neutrophils were lower in DT than in D. The segmented neutrophils were higher only in the DT when compared with group N. Regarding eosinophils there was no difference between groups. For monocytes, the counts were lower in the DT group in comparison with D.

Figure 2.1 shows the results obtained in lipidogram of rats of different groups. The concentrations of triacylglycerols (TAG) were significantly higher in group D than in all the other groups (N, NT and DT). The concentration of total cholesterol was higher in group D in relation to groups treated with the anabolic (DT and NT), but not in relation to the healthy rats without treatment (N). The values of HDL-C showed no changes resulting from physical training and treatment with testosterone. The concentration of LDL-C was higher in group D only in relation to group NT.

Figure 2.2 shows the values of glycemia and lactatemia before and after the test

of maximal effort for rats of different groups. Before the test, blood glucose was higher in the D group, followed by the DT group. The blood glucose values dropped significantly after the maximal effort test in all experimental groups, but still remained higher in group D.

Regarding lactatemia, there was no difference between groups before the effort test (Fig. 2). After the test of maximum effort, the blood lactate concentration increased in all groups. It increased more in group D compared to groups NT and DT.

Figure 2.3 shows the activity values of AST and CK after the effort test in all experimental groups. The activity of AST was lower in animals of group NT compared to animals in groups D and DT. The activity of CK was higher in group D when compared to groups NT and DT.

Table 2.3 shows time of forced swim and weight of the visceral fat in rats of different groups. Animals treated with testosterone (NT and DT) had longer times of forced swimming than their respective non-treated controls (N and D). The amount of visceral fat was lower in groups treated with anabolic (NT and DT) in relation to their respective untreated controls (N and D).

Table 2.1. Erythrogram of rats subjected to six weeks of regular exercise followed by maximal effort test

Variables	Without treatment		With treatment	
	Normal	Diabetic	Normal	Diabetic
	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
Hemoglobin (g/dl)	12.67±1.62 ^a	12.63±1.15 ^a	14.61±0.80 ^b	14.61±0.83 ^b
Erythrocytes (10 ⁶ /μl)	8.09±0.19 ^a	7.78±0.45 ^a	8.85±0.44 ^b	8.69±0.40 ^b
Hematocrit (%)	45.50±3.59 ^a	44.85±4.40 ^a	51.32±3.07 ^b	51.77±2.20 ^b
MCV (μm ³)	52.57±1.71 ^a	55.62±2.38 ^{ab}	57.25±2.18 ^{bc}	59.62±3.50 ^c
MCH (pg)	16.50±0.38 ^a	17.60±0.55 ^{ab}	17.86±0.67 ^b	17.93±0.44 ^b
MCHC (%)	30.21±0.50 ^a	31.30±0.91 ^a	32.61±0.84	30.70±1.24 ^a

* MCV (mean corpuscular volume); MCH (mean corpuscular hemoglobin); MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration).

** Averages followed by same letter are not different (Tukey) at a significance level of 0.05.

Table 2.2. Leucogram of rats Wistar subjected to six weeks of regular exercise followed by maximal effort test

Variables	Without treatment		With treatment	
	Normal	Diabetic	Normal	Diabetic
Leukocytes (cells/ μ l)	4100.0 $\pm$ 486.5 ^a	4612.5 $\pm$ 458.0 ^a	6025.0 $\pm$ 384.5 ^b	6000.0 $\pm$ 1192.0 ^b
Total neutrophils (%)	37.6 $\pm$ 7.7 ^a	45.8 $\pm$ 11.15 ^a	41.3 $\pm$ 7.0 ^a	52.9 $\pm$ 5.2
Band neutrophils (%)	2.9 $\pm$ 0.9 ^{ab}	7.0 $\pm$ 5.6 ^a	2.0 $\pm$ 1.4 ^b	2.5 $\pm$ 0.9 ^b
Segmented neutrophils (%)	34.7 $\pm$ 7.4 ^b	38.8 $\pm$ 12.0 ^{ab}	39.3 $\pm$ 7.7 ^{ab}	50.4 $\pm$ 5.5 ^a
Lymphocytes (%)	58.6 $\pm$ 5.4 ^b	46.1 $\pm$ 12.1 ^a	55.6 $\pm$ 5.6 ^{ab}	47.5 $\pm$ 5.1 ^a
Eosinophils (%)	1.6 $\pm$ 0.5 ^a	0.8 $\pm$ 0.7 ^a	1.4 $\pm$ 0.5 ^a	1.3 $\pm$ 0.7 ^a
Basophils (%)	0	0	0	0
Monocytes (%)	5.6 $\pm$ 1.5 ^{ab}	6.9 $\pm$ 3.9 ^a	5.8 $\pm$ 3.5 ^{ab}	2.2 $\pm$ 2.0 ^b

* Averages followed by same letter are not different (Tukey) at a significance level of 0.05.

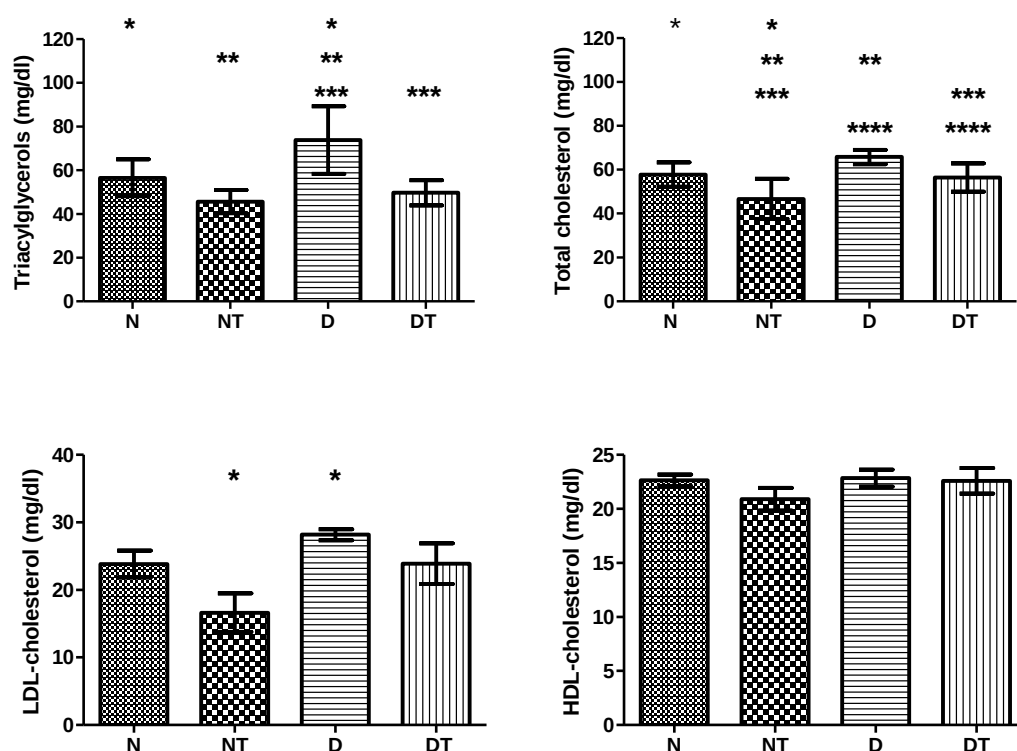


Figure 2.1. Plasma concentrations of triacylglycerols, total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol after the maximal exercise test. The symbols N, NT, D and DT represent normal, treated normal, diabetic and treated diabetic rats, respectively. Values with the same symbol are significantly different ($P < 0.05$) when compared by Tukey test.

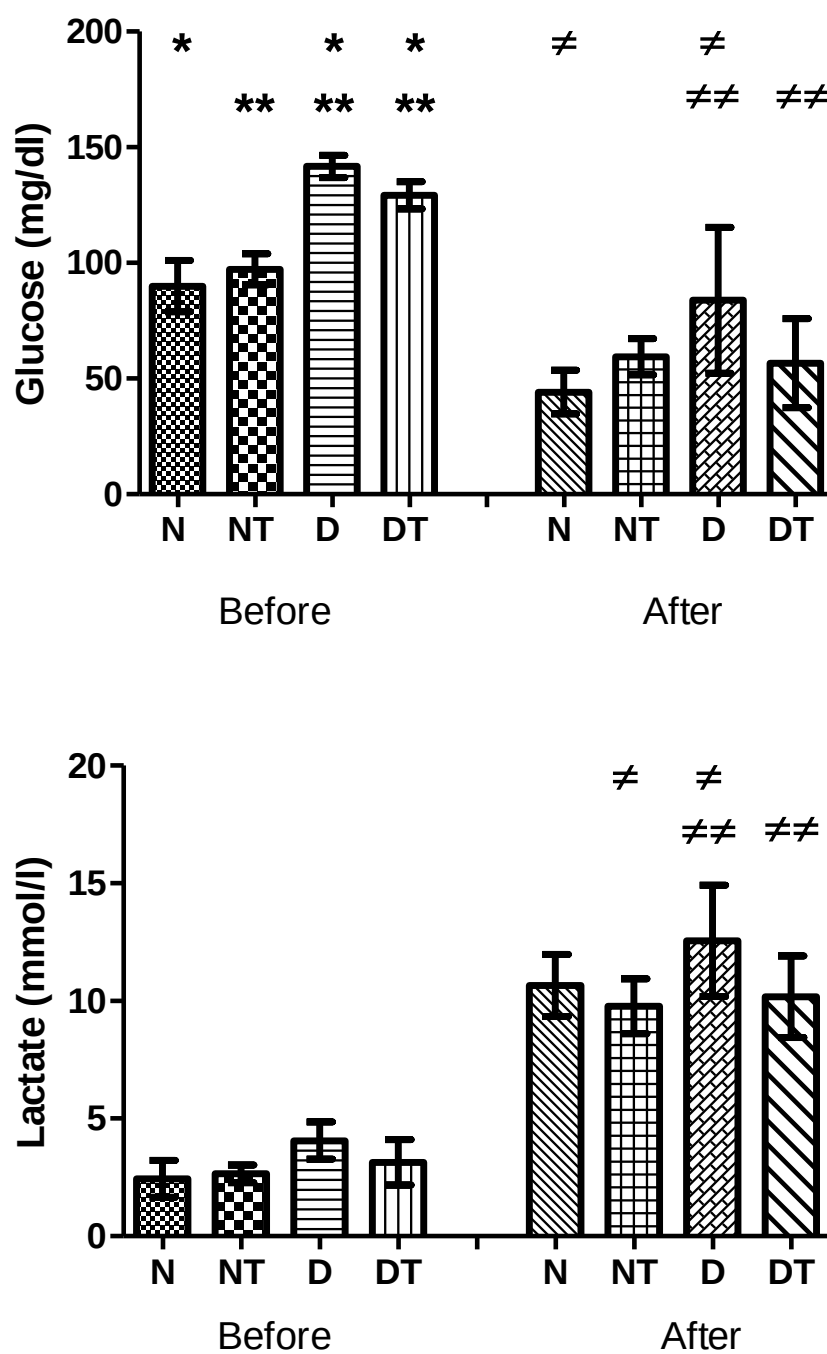


Figure 2.2. Plasma concentrations of glucose and lactate before and after the maximal exercise test. The symbols N, NT, D and DT represent normal, treated normal, diabetic and treated diabetic rats, respectively. Values with the same symbol are significantly different ($P < 0.05$) when compared by Tukey test.

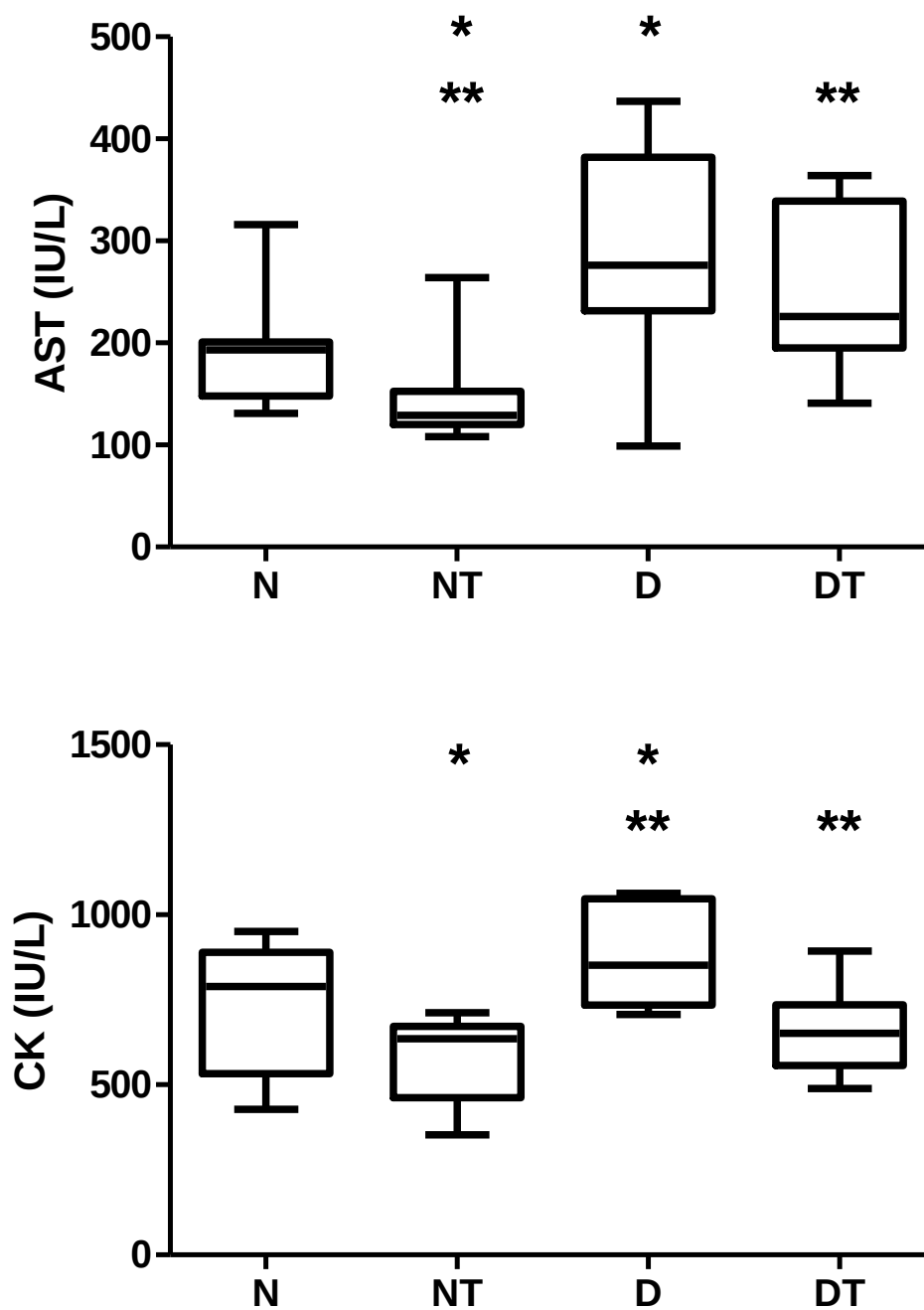


Figure 2.3. Plasma levels of activities of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) after the maximal exercise test. The symbols N, NT, D and DT represent normal, treated normal, diabetic and treated diabetic rats, respectively. Values with the same symbol are significantly different ($P < 0.05$) when compared by Tukey test.

Table 2.3. Swimming time and mass of visceral fat of rats subjected to six weeks of regular exercise followed by maximal effort test

Parameter	Without treatment		With treatment	
	Normal	Diabetic	Normal	Diabetic
	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
Swimming time (min)	203.75±71.92	119.16±55.34	305.8±34.36	163.8±67.51
Visceral fat (g)	4.22±1.84	2.27±1.72	1.68±0.93 ^a	1.57±0.65 ^a
	(1.34%)	(0.69%)	(0.55%)	(0.48%)

* Averages followed by same letter are not different (Tukey) at a significance level of 0.05.

** Values between parentheses represent the percentage of visceral fat in relation to the body mass.

Discussion

In the conditions considered in this study, treatment with testosterone produced an increase in the time of forced swimming in normal and diabetic rats in relation to their respective untreated controls. The hematological and biochemical records presented in this work should probably reflect some of the reasons that led to the change in performance of animals and any problems associated with treatment.

The decrease of CK in the diabetic rats treated with testosterone (**Fig. 2.3**) seems a remarkable fact, since elevations in blood activities of CK and AST from the liver have been reported in athletes using anabolic steroids [24] and even in athletes who do not use these substances [25]. It seems reasonable to admit, then, that the anabolic might have increased the resistance of skeletal muscle fibers against injury in the diabetic group.

Although elevation in CK had been also attributed to increased permeability of the sarcolemma during exercise [26,27,28], the activity levels of serum CK are good markers of muscle injury [29]. The blood levels of CK are associated to the intensity of exercise when duration is kept constant [28]. The metabolic stress and the actions of contraction and relaxation can cause mechanical stress to the point of damaging the muscle tissue [30]. In fact, a suitable training program for the physical fitness should not lead to sharp increase in the activities of AST and CK in plasma or serum [31].

The swimming by longer time in the treated group could also be due to increased availability of fatty acids in plasma, due to the mobilization of fat stores, since visceral fat actually fell in the animals treated with the anabolic. Testosterone might be associated with reduction in visceral fat content [32], since that aged rats have more visceral fat and produce less testosterone.

The metabolism of fatty acids involves higher consumption of oxygen than metabolism of glycogen associated with anaerobic glycolysis. It is well known that an increased necessity of oxygen stimulates the release of erythropoietin and, consequently, the production of red blood cells. Indeed, the quantity of erythrocytes, the concentration of hemoglobin and hematocrit values were higher in treated animals. This im-

provement in the erythrogram of the treated group would favor the consumption of oxygen and would increase the energetic efficiency of the aerobic catabolism. Indeed, after the exhaustion test, the amount of lactate in the blood of the diabetic rats was lower in the treated group than in non-treated (**Fig. 2.2**). This indicates that use of anabolic steroid associated to physical training was effective in aerobic conditioning of the animals.

Furthermore, the use of anabolic was associated with reduction in blood glucose, especially in the diabetic group (**Fig. 2.2**), as would be desirable.

Further evidence of better utilization of fat induced by treatment with testosterone is a decrease in blood levels of TAG in diabetic rats (**Fig. 2.1**). The use of steroids combined with the practice of exercise increases the demand for fatty acids in energy metabolism, which certainly must be the factor responsible for decreased levels of TAG in this work.

The concentration of total cholesterol decreased significantly in healthy animals and in diabetic animals treated with testosterone, without association with changes in levels of HDL-cholesterol (**Fig. 2.1**), what agrees with the results reported by [33]. Unlike that article, however, there was no decrease in levels of LDL-cholesterol in our work.

Some differences between the responses associated with our experimental design in relation to the literature should be the result of the complexity of the system. Undoubtedly, there must be differences and antagonisms in the results of the combination of time, nature and intensity of exercises with the nature, dose and duration of treatment with anabolic steroids.

Although the acute exercise is associated with elevated levels of cortisol and catecholamines, which would decrease the amount of leukocytes [34,35,36], and predominantly with elevation in the blood levels of white cells [37].

In our study the combination of anabolic with the program of exercise, followed by the exhaustion test, was associated with increased number of leukocytes in healthy

and diabetic rats (**Table 2.2**). This change should not be a consequence of the exhaustion test, but certainly of the use of anabolic, because the levels of leucocytes were higher in the groups treated with testosterone. These alterations could be due to decrease of oxygen in the blood or increase in mitotic activity of bone marrow cells, which may reflect exacerbation of the inflammatory processes, especially in the diabetic rats [38,39].

Conclusions

The combination of the use of testosterone with physical training during four weeks, followed by maximal effort test, produced elevations of hemoglobin, hematocrit and erythrocytes in healthy elderly rats and in elderly rats with alloxan-induced diabetes. Although these elevations had been greater in normal rats, they were associated with improvement in aerobic metabolism of fatty acids and glucose in diabetic animals. The hematological and biochemical changes were also associated with improvement in physiological characteristics, with increase of the swimming time and decrease of visceral fat levels in normal and diabetic animals. However, treatment with testosterone produced leukogram changes that may indicate exacerbation of inflammatory processes, especially among diabetic rats.

References

- [1] American Diabetes Association. Diagnosis and classifications of diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005;28:37-42.
- [2] Elliott JI, Dewchand H, Altmann DM. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking β cells. *Clinical Experimental Immunology* 1997;109:116-120.
- [3] Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical Therapeutics* 2001;23:1355-1390.
- [4] Bardin CW. The anabolic action of testosterone. *New England Journal of Medicine* 1996;335:52-53.
- [5] Urban RJ. Effects of testosterone and growth hormone on muscle function. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1999;134:7-10.
- [6] Arnold AM, Peralta JM, Thonney ML. Ontogeny of growth hormone, insulin-like growth factor-I, estradiol and cortisol in the growing lamb: effect of testosterone. *Journal of Endocrinology* 1996;150:391-399.
- [7] Bhasin S, Woodhouse LA, Strorer TW. Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *Journal of Endocrinology* 2001;170:27-38.
- [8] Tamaki T, Uchiyama S, Uchiyama Y, Akatsuka A, Roy RR, Edgerton VR. Anabolic steroids increase exercise tolerance. *American Journal of Physiology* 2001;280:973-981.
- [9] Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL. The immune response to exercise. *Seminars in Hematology* 1994;31:166-179.
- [10] Cumming D. Influence of aerobic versus anaerobic exercise on male reproductive hormones. *Clinical Journal of Sport Medicine* 1996;6:141-150.
- [11] Mackinnon LT. Immunity in athletes. *International Journal of Sports Medicine* 1997;18:62-68.
- [12] Borba-Murad GR, Souza H M, Lopes G, Ferreira EB, Dambroso D, Bazotte RB. Changes in glycemia induced by exercise in rats: contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 1998;102:113-123.
- [13] Chao TC, Van Alten PJ, Walter R J. Steroid sex hormone and macrophage function: modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. *American*

Journal of Reproductive Immunology 1994;32:43-52.

- [14] Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews* 1987;8:1-28.
- [15] Felig P, Wahren J. Fuel homeostasis in exercise. *New England Journal of Medicine* 1975;293:1078-1084.
- [16] Koivisto VA, Soman V, Nadel E, Tamborlane WV, Felig P. Exercise and non-insulin: insulin binding, insulin mobilization and counter regulatory hormone secretion. *Federation Proceedings, Bethesda* 1980;39:1481-1486.
- [17] Kennedy MC, O'sullivan AJ. Do anabolic-androgenic steroids enhance sporting performance. *The Medical Journal of Australia* 1997;166:60-61.
- [18] Frajblat M, Amaral VLL, Rivera EAB. Bem estar em animais de laboratório. In R. Christofolletti AA, Hausen Beck, editors. *Ética, Ciência e Desenvolvimento*, Itajaí: Editora da Universidade do Vale do Itajaí; 2006; p. 117-141.
- [19] Hegde PS, Namakkal S, Rajasekaran TS, Chandra T. Effects of the antioxidant properties of millet species on oxidative stress and glycemic status in alloxan-induced rats. *Nutrition Research* 2005;25:1109-1120.
- [20] Singh KN, Chandra V. Hypoglycaemic and hypocholesterolaemic effects of proteins of seeds in young albino rats. *Journal of the Indian Medical Association* 1977; 10:201-203.
- [21] Ostman-Smith I. Adaptative changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. *Acta Physiologica Scandinavica* 1979;477:1-118.
- [22] Trifunovic GR, Norton MJ, Duffield P, Avraam AJ. An androgenic steroid decreases left ventricular compliance in rats. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 1995;268:1096-1105.
- [23] Friedewald WT, Levy R I, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.*1972;18:499-502.
- [24] Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroid in athletes. A constant threat. *Toxicology Letters* 2005;158:167-175.
- [25] Hough DO. Anabolic steroid and ergogenic aids. *American Family Physician*

1990;41:1157-1164.

- [26] Noakes TD. Effect of exercise on serum enzyme activities in humans. *Sports Medicine* 1987;4:245-267.
- [27] Valberg SJ. Muscular causes of exercise intolerance in horses. *The Veterinary Clinics of North America* 1996;3:495-515.
- [28] Harris PA, Marlin DJ, Gray J. Plasma aspartate aminotransferase and creatine kinase activities in thoroughbred racehorses in relation to age, sex, exercise and training. *The Veterinary Journal* 1998;155:295-304.
- [29] Mujika I, Padilla S, Pyne D, Busso T. Physiological changes associated with the pre-event taper in athletes. *Sports Medicine* 2004;34:891-927.
- [30] Lieber RL, Shah S, Fridén J. Cytoskeletal disruption after eccentric contraction-induced muscle injury. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2002;403:S90-S99.
- [31] Bogin E, Otto F, Ibañez A. *Patología Clínica Veterinaria*. Assunción: Maknografic; 1989, 192 pp.
- [32] Tsai EC, Boylo EJ, Leonetti DL, Fujimoto WY. Low serum testosterone level as a predictor of increased visceral fat in Japanese-American men. *International Journal of Obesity and Related Metabolical Disorders* 2000;24:485-491.
- [33] Ebenbichler CF, Sturm W, Ganzer H, Bodner J, Mangweth B, Ritsch A. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. *Atherosclerosis* 2001;158:483-490.
- [34] Eichner ER. Contagious infections in competitive sports. *Sports Science Exchange* 1995;3:1-4.
- [35] Nieman DC. Immunity in athletes: current issues. *Sports Science Exchange* 1998;2:1-11.
- [36] Rowbottom DG, Green KJ. Acute exercise effects on the immune system. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2000;7:396-405.
- [37] Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev* 2005;11:64-85.
- [38] Alonso JC, Huecas V, Alonso J A, Abelenda M, Muiioz-Puhdo R, Puerta ML. Hematology and blood chemistry of adult white storks (*Ciconia ciconia*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 1991;98A:395-397.

- [39] Puerta M, Nava M P, Venero C, Veiga J P. Hematology and plasma chemistry of (*Passer domesticus*) along the summer after testosterone treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1995;110:303-307.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DE EXERCÍCIO DE ULTRADURAÇÃO SOBRE VARIÁVEIS SANGUÍNEAS E SALIVARES DE ATLETAS

INFLUÊNCIA DE EXERCÍCIO DE ULTRADURAÇÃO SOBRE VARIÁVEIS SANGUÍNEAS E SALIVARES DE ATLETAS

Romeu Paulo Martins Silva^{a,b}, Alexandre Vilaça^c, Fredy Costa Guerra^c, Antonio Vicente Mundim^a, Pâmella Ferreira Rodrigues^c, Guilherme Gualarte De Agostini^a, Nilson Penha-Silva^{a,*}

^aInstitute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^bFederal University of Acre, Cruzeiro do Sul, AC, Brazil

^cUniversity Center of the Araxá Plateau, Araxá, MG, Brazil

*Correspondence: N. Penha-Silva, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

Resumo

[Introdução] As corridas de aventura (provas combinadas de diversas modalidades de ultra-*endurance*) têm sido cada vez mais procuradas por proporcionar diferentes experiências esportivas, mas poucos estudos têm sido realizados para avaliar as alterações provocadas por elas no organismo dos atletas. **[Objetivo]** Este trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência de alterações fisiológicas, hematológicas, imunológicas e bioquímicas em esporte de longuíssima duração e pouco descanso. **[Métodos]** Vinte e cinco atletas profissionais, sendo 15 homens (idade de $31,4 \pm 5,36$ anos, peso corporal de $77,13 \pm 4,7$ kg) e 10 mulheres (idade de $27,8 \pm 5,18$ anos, peso corporal de $61,3 \pm 4,42$ kg) percorreram 460 km por 4 dias na competição de corrida de aventura de uma edição internacional do *Ecomotion/Pro AR World*. Amostras de sangue e saliva foram coletadas antes e após a competição. **[Resultados]** Houve elevações dos níveis de óxido nítrico (NO), proteínas totais, α -amilase e cortisol e diminuição nos níveis de IgA na saliva após a corrida. As variações percentuais relativas de NO, proteínas totais, α -amilase, IgA e cortisol foram significativamente maiores nas mulheres que nos homens. No sangue houve elevações nos níveis de lactato e glicose, e diminuição na percentagem de saturação da hemoglobina por O₂. Houve menores variações percen-

tuais relativas dos níveis de glicose e lactato e maior variação percentual relativa da saturação da hemoglobina por O₂ nas mulheres que nos homens. As quantidades de plaquetas, leucócitos, neutrófilos totais e segmentados ficaram mais elevadas após a competição e as elevações percentuais relativas foram significativamente maiores no grupo das atletas. Houve queda nos valores de linfócitos, eosinófilos e monócitos, com reduções percentuais relativas de linfócitos e monócitos significativamente maiores nas atletas que nos atletas. Os valores de hemoglobina, hemácias e hematócrito diminuíram após a competição, sem diferença estatisticamente significantes entre os sexos. Houve elevações nas atividades séricas de CK total, CKMB, ALT, AST e LDH ao término da prova ($p<0,05$), com elevações significativamente maiores da CK total, CKMB e LDH nos homens e de ALT nas mulheres. **[Conclusão]** Com base nas alterações sanguíneas e salivares pode-se concluir que os exercícios de longa duração com momentos de alta intensidade, pouco sono e descanso da corrida de aventura promoveram aumento do estresse, lesões musculares, anemia e alterações no sistema imunitário que podem prejudicar o estado de saúde e o rendimento esportivo dos atletas.

Introdução

Exercícios multiesportivos de longa duração induzem pronunciadas alterações musculares, hematológicas e bioquímicas [ZALCMAN et al., 2007; LEVADA-PIRES et al., 2010].

A corrida de aventura é uma modalidade de competição multiesportiva (*mountain bike, rafting, canoagem, trekking* com orientação, técnicas verticais e natação) de ultraduração (de 36 horas até 10 dias ou mais), pouco sono e pequeno intervalo de recuperação, que usa obstáculos naturais (rios, montanhas, florestas e outros ambientes naturais) em percursos de distância variável (de 30 a 600 km). A exposição do corpo a essa elevada intensidade e tempo de esforço aumenta a possibilidade de ocorrência de lesões musculares [BERGLUND e MCKENZIE, 1994; PFEIFFER e KRONISCH, 1995; KRONISCH, 1998], alterações hematológicas [MALM, 2004; FEHRENBACH e SCHNEIDER, 2006; GLEESON, 2007] e bioquímicas.

A possibilidade de avaliar o impacto do exercício intenso por meio da análise da saliva, que é um ultrafiltrado do sangue, é muito interessante, pelo fato da coleta da saliva constituir um procedimento de natureza não invasiva e de fácil operacionalização.

As mudanças na composição da saliva compreendem alterações nos níveis de IgA, que funciona como primeira barreira de proteção contra infecção nas vias aéreas superiores [STEERENBERG et al., 1997; BISHOPE et al., 2000; BISHOP et al., 2006], de cortisol [DAVISON e GLEESON, 2006; NEUBAUER et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010] e de α -amilase [WALSH et al., 2003], cuja produção na glândula parótida é aumentada pela ação da noradrenalina [NATER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010]. É por isto que a avaliação dos níveis de proteínas e de cortisol na saliva tem sido proposta como critério de avaliação do estresse provocado pelo exercício físico durante competições esportivas [GORDIS et al., 2006; NIEROP et al., 2006; VAN STEGEREN et al., 2006; VAN VEEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010].

A concentração de proteína na saliva antes, durante e após o exercício varia de maneira semelhante ao nível lactato no sangue. Ela aumenta durante o exercício e

diminui depois de algumas horas [[BORTOLINI et al., 2009](#); [OLIVEIRA et al., 2010](#)].

O presente estudo avaliou as alterações hematológicas e bioquímicas séricas e salivares de atletas voluntários que participaram da corrida de aventura *Ecomotion/Pro AR World*.

Material e métodos

Atletas

O estudo foi iniciado após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Os participantes assinaram um termo de consentimento após esclarecimento dos procedimentos que seriam realizados durante e após a competição. A amostra deste estudo foi composta por 15 homens (idade de $31,4 \pm 5,36$ anos e peso corporal de $77,13 \pm 4,7$ kg) e 10 mulheres (idade de $27,8 \pm 5,18$ anos e peso corporal de $61,3 \pm 4,42$ kg), que participaram da edição internacional do *Ecomotion/Pro Adventure Race*. Aos competidores foi permitida a ingestão de água e alimento à vontade.

A competição

O *Ecomotion/Pro Adventure Race World* teve um percurso de 470 km dividido nas seguintes modalidades esportivas: 90 km de *mountain bike* (19,1%), 211 km de *trekking* (44,9%), 169 km de canoagem (36%) com caiaque duplo e caiaque inflável e 70 m de rapel (0,015%). A duração foi de 4 a 5 dias, com mínimo de 5 horas de sono.

Coleta e análise das amostras de saliva

As amostras de saliva foram coletadas antes (logo após acordar) e imediatamente depois da competição, após cuidadosa higienização oral. A salivação foi estimulada pela mastigação de um tablete de 0,5 g de parafina (Parafilm™). As amostras de saliva foram acondicionadas em mini-tubos pré-resfriados (4 °C) e armazenadas a -20 °C para análise da atividade de α -amilase, proteínas totais, óxido nítrico, IgA e cortisol.

Análise das amostras de saliva

Todas as análises foram conduzidas em duplicatas.

A atividade da α -amilase foi determinada pela análise espectrofotométrica da cinética de hidrólise do substrato 2-cloro-*p*-nitrofenil- α -D-maltotriosídeo (CNP-G3) a 405 nm (Amilasa 405, Wiener lab, Argentina).

As proteínas totais foram quantificadas pelo método do biureto usando kit comercial (UCFS, DIASYS™, Alemanha) e leituras espectrofotométricas a 604 a 700 nm (Autoanalyser Architect c8000, Abbot™, IL, USA).

A concentração do óxido nítrico foi determinada colorimetricamente a 570 nm em leitora de microplaca (Titertek multiskan plus MK11) [GRANGER et al., 1995]. A análise de dados foi conduzida com a utilização do aplicativo *Microplate Manager version 4.0* (Bio-Rad Laboratories, USA).

A IgA total foi analisada por uma adaptação do teste ELISA [MACKINNON e JENKINS, 1993; SILVA et al., 2001], usando placas de polietileno (Nunc F96 Maxi Sorp, Fisher Scientific, Wohlen, Suíça) sensibilizadas com anticorpo anti-IgA humano (Sigma Chemical, Buchs) em tampão carbonato a 0,06 M, pH 9,6, a 4 °C por 12 horas e em seguida lavadas e bloqueadas com tampão dicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD). As amostras de saliva foram diluídas a partir de 1:2 em tampão fosfato a 1% com albumina bovina sérica (BSA-PBS-T) e incubadas por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagem, foram adicionados um conjugado biotinilado anti-IgA marcado com peroxidase e o substrato H₂O₂ em tampão OPD (tampão cromógeno). Após incubação em temperatura ambiente por 1 h, os valores de densidade óptica (DO) foram determinados na leitora de microplaca à 405 nm. Os valores da IgA total foram divididos pelo valor das proteínas totais na saliva para determinação dos valores de IgA específica.

O cortisol foi dosado espectrofotometricamente com a utilização de Kit comercial (Salimetrics, USA), com leitura da densidade óptica a 450 nm em leitor de ELISA.

Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue foram coletados antes (logo após acordar) e imediatamente depois da competição. Alíquotas de 25 μ L de sangue para dosagem de lactato

foram colhidas do lóbulo da orelha, após assepsia local, em capilares de vidro heparinizados e calibrados, e transferidos para micro-tubos contendo 50 µL de fluoreto de sódio a 1%. Para a execução do hemograma foram coletadas, por punção da veia radial, amostras de 3 mL de sangue em tubos estéreis contendo 0,1 mL de K₃EDTA a 10%. Para a execução das dosagens bioquímicas foram coletadas amostras de 3 mL de sangue em tubos sem anticoagulante, contendo gel separador e ativador de coágulo, para posterior obtenção do soro por centrifugação a 720 x g por cinco minutos.

Dosagem do lactato sanguíneo

O lactato foi dosado em duplicata, por método eletro-enzimático em um Sport L-lactate analyser YSI 1500 (YSI Inc, yellow Spring, Ohio).

Hemogramas

As determinações de hemograma foram feitas em contador automático de células sanguíneas ABX Micros 60 (Horiba ABX Diagnostics, Bangkok, Tailândia), no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Santa Casa de Diamantina, MG.

Determinação das atividades séricas de ALT, AST, LDH, CK e CKMB

As atividades de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase total (CK total) e isoforma miocárdica da creatina quinase (CK-MB) foram determinadas por método colorimétrico automatizado, utilizando kits comerciais específicos (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil) em analisador automático multicanal (Chem Well, Palm City, FL, EUA).

Aferição da frequência cardíaca, pressão arterial e saturação da hemoglobina Hb%

Antes e depois da competição foram aferidas a frequência cardíaca (monitor cardíaco Polar RS800CX Electro Oy, Kempele, Finlândia) e a pressão arterial (stetoscópio e esfigmomanômetro de coluna de mercúrio (Sanny, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). A saturação da hemoglobina foi determinada por oxímetro de pulso.

Análises estatísticas e edições de gráficos

A existência de distribuição normal nos resultados obtidos foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A existência de diferença estatisticamente significativa a um nível de 5% foi avaliada por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. As análises e edições de gráficos foram conduzidas com a utilização do aplicativo GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Resultados

A **Tabela 3.1** mostra o comportamento de diversas variáveis bioquímicas do sangue (hemoglobina, glicose e lactato) e da saliva (nitrito, α -amilase, proteínas totais, IgA e cortisol) dos voluntários deste estudo dos momentos anterior e imediatamente posterior à corrida de aventura. Quando se considera a população total, sem estratificação por sexo, dentre todas as variáveis analisadas houve diminuição significativa apenas da percentagem de saturação da hemoglobina por O_2 e da concentração de IgA salivar. Para todas as demais variáveis sanguíneas (lactato e glicose) e salivares (nitrito, α -amilase, proteínas totais e cortisol) houve aumento significativo durante a competição. Com a estratificação por sexo, a tendência observada para todo o grupo (diminuição significativa da percentagem de saturação da hemoglobina e da concentração de IgA e elevação significativa de lactato, glicose, nitrito, α -amilase, proteínas totais e cortisol) foi completamente confirmada para o sexo feminino, mas não para o masculino, em que não se observou diferença significativa na percentagem de saturação da hemoglobina por O_2 .

Após a competição, as elevações percentuais relativas de nitrito, α -amilase e cortisol foram 24,11%, 37,25% e 36,55% maiores nas mulheres que nos homens, mas os homens tiveram elevações percentuais relativas de glicose 38,91% maiores que as mulheres. Não houve diferença estatisticamente significativa nas elevações percentuais relativas de lactato sanguíneo e proteínas totais da saliva entre os sexos. Em relação às duas variáveis cujos valores declinaram durante a competição (saturação da hemoglobina por oxigênio e IgA), os declínios percentuais relativos foram 43,01% e 22,61%, respectivamente, maiores nas mulheres do que nos homens (**Tabela 3.1**).

A **Tabela 3.2** mostra o comportamento das variáveis do eritrograma dos voluntários deste estudo dos momentos anterior e imediatamente posterior à corrida de aventura. Houve queda estatisticamente significativa nas concentrações de hemoglobina, contagens de hemácias e hematócrito, tanto na população total do estudo quanto nas populações masculina e feminina, quando analisadas separadamente. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os declínios percentuais

relativos (percentis) observados nestas variáveis. Os valores das outras variáveis (VCM, HCM, CHCM e RDW) não sofreram alterações estatisticamente significantes durante a competição, tanto na população total quanto nas populações de cada um dos sexos isoladamente.

A **Tabela 3.3** mostra o comportamento das variáveis do plaquetograma e leucograma dos voluntários deste estudo do momento anterior e o imediatamente posterior à corrida de aventura. Houve elevações significativamente diferentes nas contagens de plaquetas, leucócitos, neutrófilos totais e segmentados na população total e na população feminina. Na população masculina, as elevações observadas nas contagens de plaquetas, neutrófilos totais e segmentados foram estatisticamente significantes, mas não a elevação observada na contagem de leucócitos. As elevações percentuais relativas observadas nas contagens de plaquetas, leucócitos, neutrófilos totais e segmentados foram 45,53%, 31,50%, 55,63% e 56,98% maiores nas mulheres do que nos homens, respectivamente. As contagens de neutrófilos em bastonetes e basófilos não sofreram alterações tanto no grupo todo sem estratificação por sexo quanto nos grupos das mulheres e dos homens, separadamente. Houve diminuição significativamente diferente nas contagens de linfócitos, eosinófilos e monócitos na população total e também nas populações masculina e feminina, quando analisadas separadamente. As diminuições percentuais relativas observadas nas contagens de linfócitos e eosinófilos foram 72,13% e 65,19% maiores no grupo das mulheres em relação ao dos homens, mas a diminuição no percentil de monócitos foi 20,24% maior nos atletas do que nas atletas.

A **Figura 3.1** apresenta as atividades séricas de creatina quinase total (CK) e de sua isoenzima miocárdica (CKMB) no momento anterior e no imediatamente posterior ao término da corrida de aventura. Houve elevação estatisticamente significativa em ambas tanto na população total quanto nas populações masculina e feminina separadamente. Ambas as elevações foram significativamente maiores na população masculina que na população feminina.

A **Figura 3.2** apresenta a atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) antes e após a corrida de aventura. Houve aumento estatisticamente significativo na

atividade tanto na população total quanto nas populações masculina e feminina separadamente, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os sexos.

A **Figura 3.3** apresenta a atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) antes e após a corrida de aventura. Houve aumento estatisticamente significativo na atividade tanto na população total quanto nas populações masculina e feminina separadamente. A elevação foi significativamente maior na população masculina que na feminina.

A **Figura 3.4** apresenta a atividade sérica da enzima lactato desidrogenase total (LDH) antes e após a corrida de aventura. Houve aumento estatisticamente significativo na atividade tanto na população total quanto nas populações masculina e feminina separadamente. A elevação foi maior (4,87%) na população masculina que na feminina.

Tabela 3.1. Médias $\pm$ desvios padrões e variações percentuais relativas (percentis) de variáveis bioquímicas do sangue ou saliva dos atletas antes e após a competição.

Variáveis	Todos		Homens			Mulheres		
	Antes	Depois	Antes	Depois	Percentil	Antes	Depois	Percentil
Hb _B (%)	97,04 $\pm$ 2,50 ^a	94,41 $\pm$ 1,97 ^b	96,40 $\pm$ 3,07	95,07 $\pm$ 1,44	-2,61 $\pm$ 1,23 ^A	98,00 $\pm$ 0,67 ^a	93,50 $\pm$ 2,32 ^b	-4,58 $\pm$ 2,49 ^B
Lac _B (mM)	2,07 $\pm$ 1,19 ^a	3,61 $\pm$ 0,99 ^b	2,02 $\pm$ 1,31 ^a	4,1 $\pm$ 1 ^b	+102,69 $\pm$ 89,68	2,16 $\pm$ 1,05 ^a	3,01 $\pm$ 0,7 ^b	+93,96 $\pm$ 86,48
Glu _B (mg/dL)	79,8 $\pm$ 24,18 ^a	100,6 $\pm$ 25,96 ^b	78,47 $\pm$ 29,41 ^a	103,47 $\pm$ 31,19 ^b	+32,89 $\pm$ 67,32 ^A	81,80 $\pm$ 14,39 ^a	96,30 $\pm$ 15,83 ^b	+20,09 $\pm$ 25,05 ^B
Nitrito _S (μM)	87,85 $\pm$ 20,20 ^a	218,74 $\pm$ 46,20 ^b	92,62 $\pm$ 22,97 ^a	182,92 $\pm$ 27,61 ^b	+130,73 $\pm$ 45,20 ^A	80,71 $\pm$ 13,19 ^a	242,63 $\pm$ 40,5 ^b	+172,28 $\pm$ 56,21 ^B
Amy _S (U/mL)	1923 $\pm$ 363,42 ^a	2664,48 $\pm$ 286,42 ^b	1961 $\pm$ 380,35 ^a	2423 $\pm$ 294,78 ^b	+32,57 $\pm$ 20,15 ^A	1866 $\pm$ 380,35 ^a	2825 $\pm$ 124,85 ^b	+51,91 $\pm$ 47,19 ^B
Prot _S (mg/mL)	0,84 $\pm$ 1,12 ^a	1,00 $\pm$ 0,13 ^b	0,84 $\pm$ 0,13 ^a	0,95 $\pm$ 0,11 ^b	+14,27 $\pm$ 14,84	0,86 $\pm$ 0,13 ^a	1,11 $\pm$ 0,09 ^b	+28,73 $\pm$ 19,49
IgA _S (mg/dL)	10,42 $\pm$ 0,91 ^a	5,53 $\pm$ 1,13 ^b	10,63 $\pm$ 0,86 ^a	6,12 $\pm$ 0,97 ^b	-41,89 $\pm$ 11,26 ^A	10,18 $\pm$ 0,99 ^a	4,65 $\pm$ 0,74 ^b	-54,13 $\pm$ 7,57 ^B
Cortisol _S (μg/dL)	0,89 $\pm$ 0,04 ^a	1,11 $\pm$ 0,05 ^b	0,90 $\pm$ 0,03 ^a	1,09 $\pm$ 0,05 ^b	+20,55 $\pm$ 6,82 ^A	0,88 $\pm$ 0,05 ^a	1,16 $\pm$ 0,03 ^b	+32,39 $\pm$ 9,30 ^B

Hb = % de saturação da hemoglobina por O₂; Lac = lactato; Glu = glicose; Amy = amilase; Prot = proteínas salivares totais; IgA = Imunoglobulina; B = sangue; S = saliva. Médias em uma mesma linha seguidas de letras minúsculas diferentes dentro de cada grupo são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$). Percentis em uma mesma linha seguidos de letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

Tabela 3.2. Médias $\pm$ desvios padrões e variações percentuais relativas (percentis) das variáveis do eritrograma durante a competição.

Variáveis	Todos		Homens			Mulheres		
	Antes	Depois	Antes	Depois	Percentis	Antes	Depois	Percentis
Hemoglobina (g/dL)	15,33 $\pm$ 1,80 ^a	12,28 $\pm$ 3,90 ^b	16,21 $\pm$ 0,66 ^a	14,01 $\pm$ 0,65 ^b	– 14,19 $\pm$ 8,60	14,36 $\pm$ 0,65 ^a	11,31 $\pm$ 4,01 ^b	–9,42 $\pm$ 4,87
Hemácias ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5,33 $\pm$ 0,40 ^a	4,25 $\pm$ 0,13 ^b	5,63 $\pm$ 0,29 ^a	4,80 $\pm$ 0,51 ^b	– 12,53 $\pm$ 6,08	4,87 $\pm$ 0,33 ^a	3,89 $\pm$ 0,13 ^b	–10,47 $\pm$ 3,97
Hematócrito (%)	45,02 $\pm$ 4,90 ^a	37,85 $\pm$ 8,76 ^b	48,05 $\pm$ 1,49 ^a	39,08 $\pm$ 1,12 ^b	–14,36 $\pm$ 10,10	40,48 $\pm$ 1,67 ^a	37,15 $\pm$ 1,48 ^b	–8,08 $\pm$ 3,74
VCM (μm^3)	87,17 $\pm$ 2,97	78,76 $\pm$ 23,86	86,40 $\pm$ 23,13	79,53 $\pm$ 22,14	–1,90 $\pm$ 2,87	88,44 $\pm$ 2,29	77,60 $\pm$ 27,45	–3,79 $\pm$ 1,64
HCM (pg)	29,14 $\pm$ 1,12	26,69 $\pm$ 8,12	28,89 $\pm$ 0,77	26,94 $\pm$ 7,50	–0,43 $\pm$ 2,40	29,50 $\pm$ 1,47	26,32 $\pm$ 9,32	–1,06 $\pm$ 2,54
CHCM (%)	33,68 $\pm$ 0,64	31,20 $\pm$ 9,42	33,79 $\pm$ 0,73	31,65 $\pm$ 8,7	– 0,88 $\pm$ 3,16	33,90 $\pm$ 0,92	30,53 $\pm$ 10,75	–0,04 $\pm$ 2,59
RDW (%)	13,68 $\pm$ 0,40	12,71 $\pm$ 3,87	13,76 $\pm$ 0,33	12,94 $\pm$ 3,62	–1,05 $\pm$ 4,77	0,76 $\pm$ 4,71	12,36 $\pm$ 4,38	+1,25 $\pm$ 3,39

VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina celular média; CHCM = concentração de hemoglobina celular média; RDW = Red Cell Distribution Width. Médias em uma mesma linha seguidas de letras minúsculas diferentes dentro de cada grupo são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$). Percentis em uma mesma linha seguidos de letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

Tabela 3.3. Médias $\pm$ desvios padrões e variações percentuais relativas (percentis) de plaquetas e das variáveis do leucograma dos atletas durante a competição.

Variáveis	Todos		Homens			Mulheres		
	Antes	Depois	Antes	Depois	Percentis	Antes	Depois	Percentis
Plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{m}^3$)	190,64 $\pm$ 41,15 ^a	208,92 $\pm$ 83,34 ^b	179,80 $\pm$ 26,13 ^a	189,27 $\pm$ 68,21 ^b	+ 21,09 $\pm$ 16,44 ^A	206,90 $\pm$ 55,9 ^a	238,40 $\pm$ 98,3 ^b	+ 38,72 $\pm$ 22,94 ^B
Leucócitos (cél/s/ μL)	5910 $\pm$ 1380 ^a	7344 $\pm$ 2730 ^b	6076 $\pm$ 1299	6873 $\pm$ 2447	+ 23,37 $\pm$ 22,99 ^A	5662 $\pm$ 1542 ^a	8050 $\pm$ 3121 ^b	+ 73,74 $\pm$ 34,74 ^B
Neutrófilos totais (cél/s/ μL)	3191 $\pm$ 1054 ^a	5214 $\pm$ 2182 ^b	3354 $\pm$ 872 ^a	4925 $\pm$ 2080 ^b	+ 65,06 $\pm$ 38,37 ^A	2358 $\pm$ 5532 ^a	5648 $\pm$ 2948 ^b	+ 146,64 $\pm$ 50,51 ^B
Bastonetes (cél/s/ μL)	62 $\pm$ 44	104 $\pm$ 82	75 $\pm$ 65	97 $\pm$ 66	+ 59,52 $\pm$ 94,23	50 $\pm$ 43	126 $\pm$ 116	150,40 $\pm$ 75,10
Segmentados (cél/s/ μL)	3129 $\pm$ 1036 ^a	5042 $\pm$ 2052 ^b	3285 $\pm$ 853 ^a	4716 $\pm$ 1833 ^b	+ 62,64 $\pm$ 37,89 ^A	2897 $\pm$ 723 ^a	5532 $\pm$ 984 ^b	+ 145,61 $\pm$ 50,78 ^B
Linfócitos (cél/s/ μL)	2192 $\pm$ 533 ^a	1994 $\pm$ 513 ^b	2234 $\pm$ 589 ^a	1892 $\pm$ 521 ^b	- 9,66 $\pm$ 26,79 ^A	2128 $\pm$ 461 ^a	1567 $\pm$ 324 ^b	- 34,67 $\pm$ 15,97 ^B
Eosinófilos (cél/s/ μL)	255 $\pm$ 135 ^a	135 $\pm$ 211 ^b	232 $\pm$ 107 ^a	178 $\pm$ 89 ^b	- 15,66 $\pm$ 40,94	311,77 $\pm$ 111 ^a	133,66 $\pm$ 59,5 ^b	- 44,99 $\pm$ 28,87
Basófilos (cél/s/ μL)	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monócitos (cél/s/ μL)	278 $\pm$ 80 ^a	137 $\pm$ 73 ^b	276 $\pm$ 96 ^a	116 $\pm$ 67 ^b	- 51,28 $\pm$ 34,80 ^A	256 $\pm$ 61 ^a	158 $\pm$ 80 ^b	- 40,90 $\pm$ 31,1 ^B

Médias em uma mesma linha seguidas de letras minúsculas diferentes dentro de cada grupo são estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$).
Percentis em uma mesma linha seguidos de letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

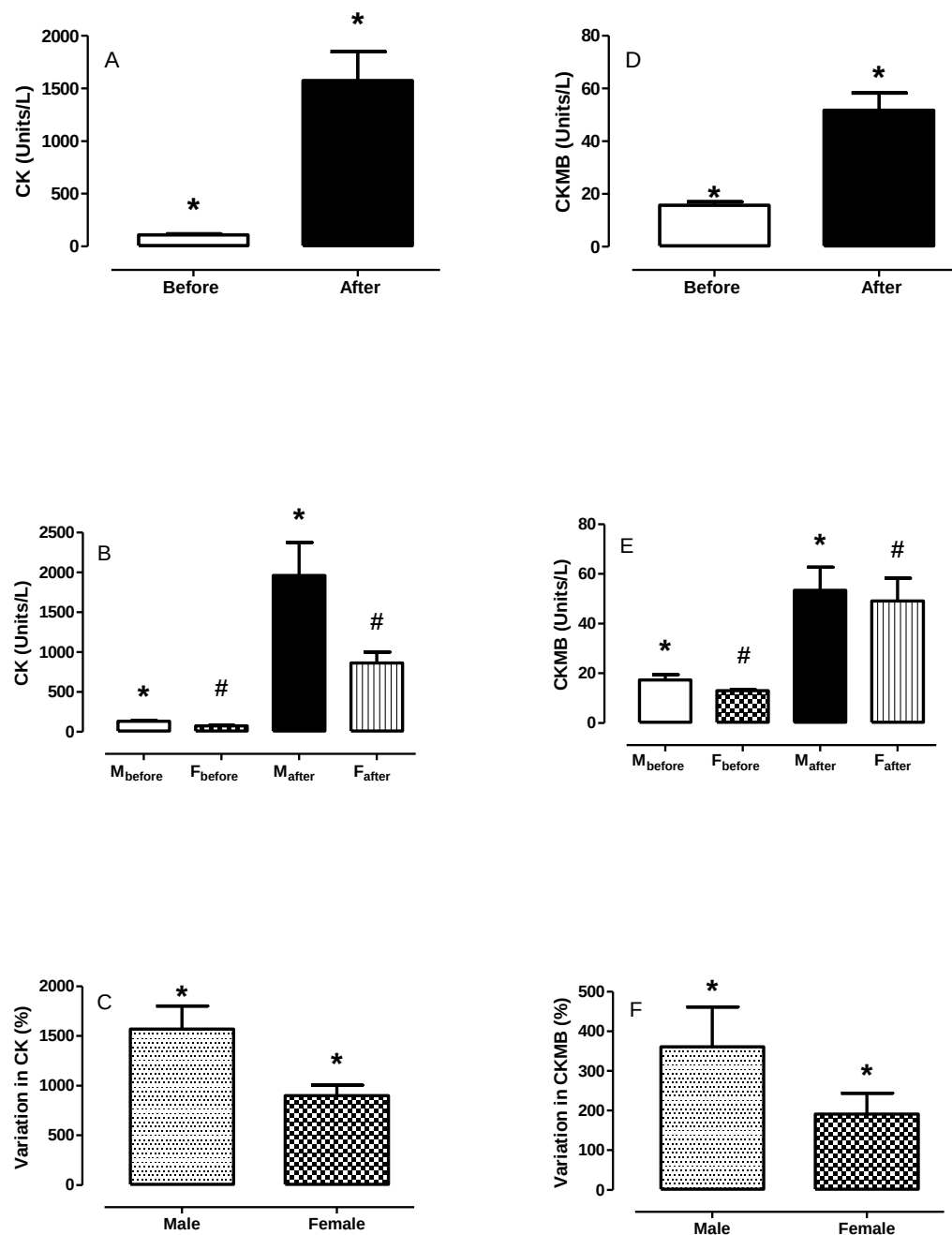


Figura 3.1. Atividades séricas da creatina quinase total (coluna esquerda) e de sua iso-enzima miocárdica (coluna direita), antes e depois da competição para todos os atletas sem (A e D) e com (B e E) estratificação por sexo, e variação percentual relativa das atividades (C e F). Valores com o mesmo símbolo (* ou #) foram significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$). M e F representam atletas do sexo masculino e do feminino, respectivamente.

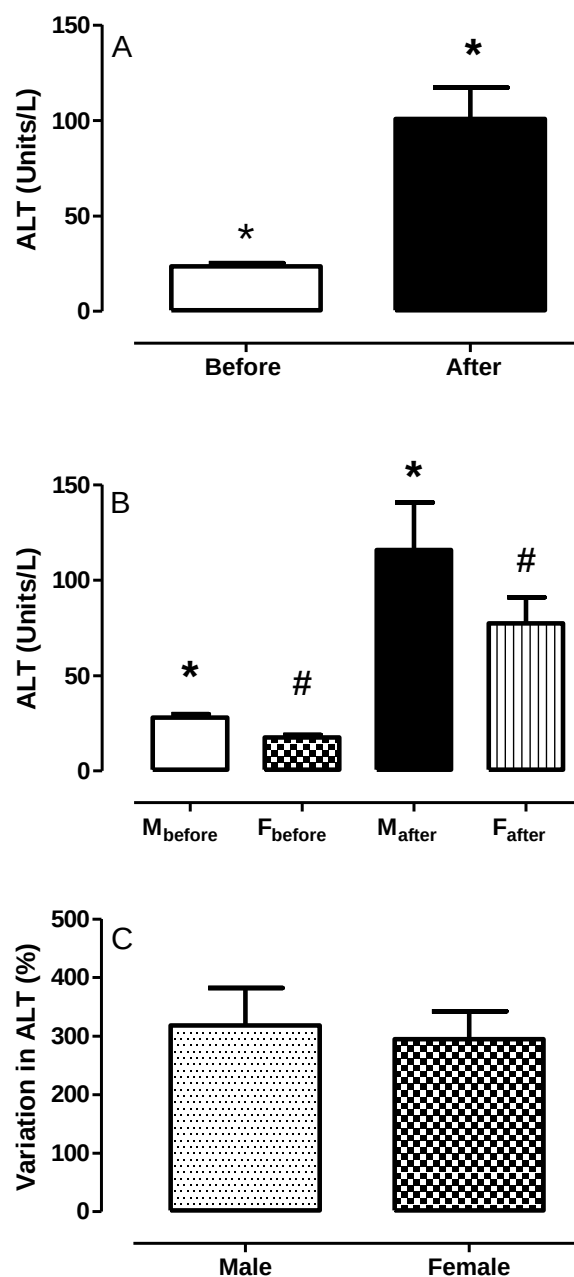


Figura 3.2. Atividade sérica da enzima alanina aminotransferase (ALT), antes e depois da competição para todos os atletas sem **(A)** e com estratificação por gênero **(B)**, e variação percentual relativa das atividades da ALT **(C)**. Valores com o mesmo símbolo (* ou #) foram significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$). M e F representam atletas do sexo masculino e do feminino, respectivamente.

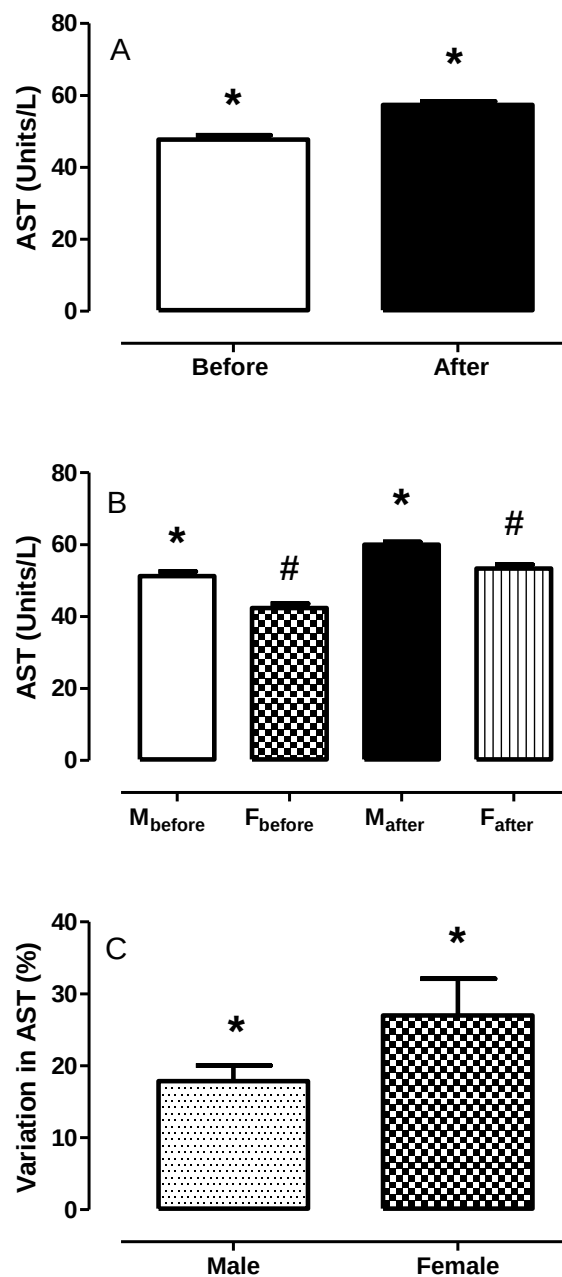


Figura 3.3. Atividade sérica da enzima aspartato aminotransferase (AST), antes e depois da competição para todos os atletas sem **(A)** e com estratificação por gênero **(B)**, e variação percentual relativa das atividades da AST **(C)**. Valores com o mesmo símbolo (* ou #) foram significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$). M e F representam atletas do sexo masculino e do feminino, respectivamente

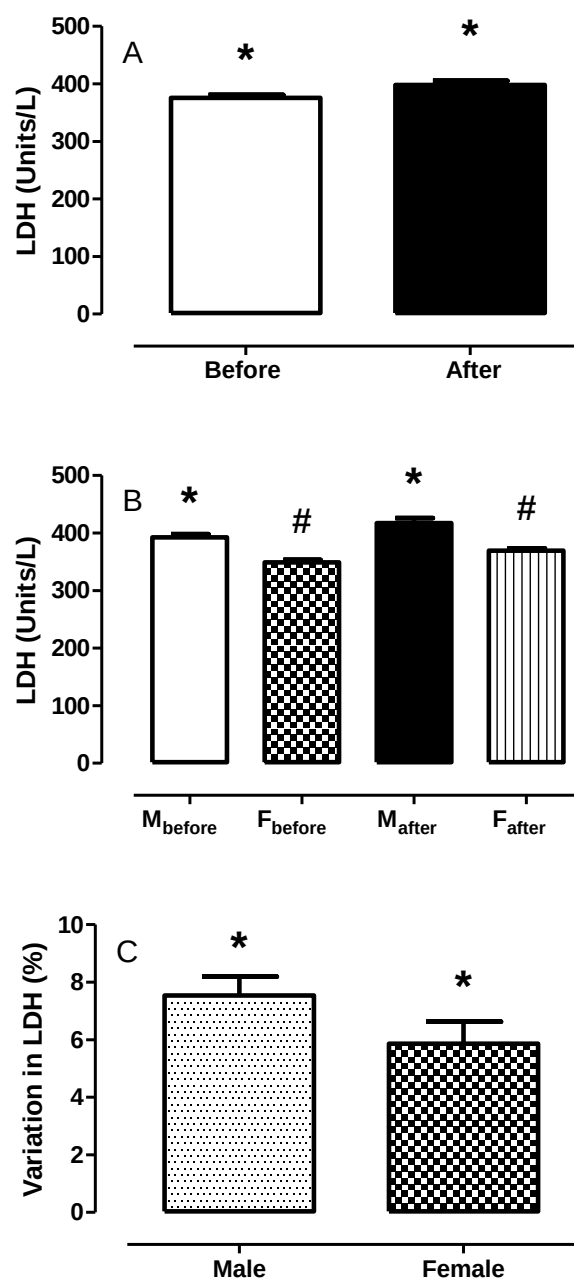


Figura 3.4. Atividade sérica da enzima lactato desidrogenase (LDH) antes e depois da competição para todos os atletas sem **(A)** e com estratificação por gênero **(B)**, e variação percentual relativa das atividades da LDH **(C)**. Valores com o mesmo símbolo (* ou #) foram significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$). M e F representam atletas do sexo masculino e do feminino, respectivamente

Discussão

Este trabalho avaliou os efeitos do exercício físico de ultraduração, privação de sono e pequeno intervalo de descanso, sobre variáveis musculares, hematológicas e bioquímicas de atletas dos gêneros masculino e feminino. Com certeza, os resultados obtidos podem ser úteis na aconselhamento e preparação para futuras competições.

Os resultados deste trabalho mostraram que a quantidade de NO (nitrito) na saliva aumentou do período anterior (pré) para o posterior (pós) da corrida de aventura. De fato, estudos prévios já haviam mostrado que a produção de NO aumenta proporcionalmente com a intensidade do exercício físico até exaustão [PERSSON et al., 1993; IWAMOTO et al., 1994] e que o treinamento regular induz aumento na concentração de NO na saliva [PANOSSIAN et al., 1999]. O aumento na produção de NO seria consequência do aumento da pressão sistólica [SUNG et al., 1990] e seria explicado pelo atrito de cisalhamento nos vasos [GATULLO et al., 1995], o que levaria a ativação da óxido nítrico sintase (NOS) [RANJAN et al., 1995]. No presente trabalho, a elevação dos níveis de NO foi maior nas atletas, possivelmente em consequência delas terem também apresentado maior frequência cardíaca e pressão arterial (dados não mostrados), o que iria aumentar o estresse de cisalhamento nos vasos.

O NO apresenta efeitos benéficos de natureza anti-aterogênica, como vasodilatação, inibição da agregação de plaquetas, da formação de trombos e da adesão de leucócitos à parede do vaso [WALLIS, 2005; VANNI et al., 2007].

As elevações nas contagens de plaquetas e leucócitos (**Tabela 3.3**) observadas neste trabalho podem estar relacionadas ao aumento nos níveis de NO (**Tabela 3.1**), pois as elevações de NO foram associadas a elevações nas contagens de plaquetas e de leucócitos, com maiores níveis de NO e maiores quantidades de plaquetas e leucócitos nas mulheres do que nos homens.

A elevação da atividade da α -amilase em todos os grupos após a competição está de acordo com relatos de que a atividade desta enzima na saliva aumenta em decorrência de estresses físico e psicológico [STEERENBERG et al., 1977; VAN STEGEREN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010].

Os aumentos na atividade de α -amilase e nas concentrações de proteínas totais na saliva e de lactato no sangue, observados neste trabalho, são coerentes com a existência de correlação entre estas variáveis [BORTOLINI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010].

Exercícios de intensidade moderada a alta e de longa duração provocaram diminuição nos níveis salivares de IgA [NIEMAN et al., 1990; BLANNIN et al., 1998; KRZYWKOWSKI et al., 2001; WALSH et al., 2002] e associados ao estresse gerado pela competição [NIEMAN, 2000; OLIVEIRA et al., 2010]. De fato, a diminuição nos níveis de IgA observada neste trabalho ocorreu com um aumento nos níveis salivares de cortisol e da α -amilase, o que deve refletir aumento do estresse pelo exercício. A secreção do cortisol salivar aumenta durante exercícios intensos ou moderados de diferentes tipos de exercícios juntamente com o estado de ansiedade e estresse psicológico [TESSITORE et al., 2008; DAVISON e GLEESON, 2006; NEUBAUER et al., 2008]. Neste estudo, as mulheres tiveram elevações significativamente maiores nos valores de cortisol após a competição do que os homens. Maiores valores de cortisol plasmático em mulheres do que em homens foram também reportados [BONIFAZI et al., 2000; CHATARD et al., 2002]. A elevação sistêmica do cortisol em atividades de longa ou curta duração [BISHOP et al., 2003; DAVISON e GLEESON, 2006; NEUBAUER et al., 2008] é fundamental para manter os níveis de glicose no sangue. De fato, quando ocorreu a elevação nos níveis de cortisol neste trabalho os níveis de glicose também se elevaram, embora os níveis de cortisol tenham-se elevado mais nas mulheres do que nos homens e o contrário tenha ocorrido com os níveis de glicose.

A redução no número de linfócitos e aumento na quantidade de leucócitos após a prova, como observado nos atletas deste estudo, está de acordo com resultados reportados após maratona de 42 km [KRATZ et al., 2006]. Exercícios exaustivos de apenas alguns minutos até algumas horas causam elevação na quantidade de leucócitos que é tanto maior quanto menor é o preparo físico e/ou maior é a intensidade do exercício [WU et al., 2004], em decorrência de resposta inflamatória à injúria ao tecido, com concomitante aumento da concentração sanguínea de proteína C reativa [SIEGEL et al., 2001] e dos níveis séricos de CK e LDH [SUZUKI et al., 2003; PEAKE et al., 2005]. No presente estudo, a diminuição na quantidade de linfócitos e aumento na quantidade

de de leucócitos foi acompanhada de elevação nas atividades séricas de CK e LDH, certamente em decorrência de resposta inflamatória à lesão muscular, pois os atletas se queixaram de muita dor e tiveram que ficar em repouso após a competição. A elevação na contagem de leucócitos também foi atribuída à elevação nos níveis sanguíneos de catecolaminas e/ou de cortisol [[PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000](#); [NATALE et al., 2003](#); [WU et al., 2004](#)]. De fato, neste estudo também houve associação entre a quantidade de leucócitos e a concentração de cortisol na saliva após a corrida de aventura, em níveis percentuais relativos que foram maiores nas mulheres do que nos homens, embora as mulheres tenham apresentado menor elevação percentual relativa de CK e LDH do que os homens.

A diminuição no número de monócitos observada após a competição neste estudo está de acordo com os resultados reportados por [Kratz et al. \[2002\]](#), mas em desacordo com aqueles reportados por [Wu et al. \[2004\]](#).

O aumento no número de plaquetas e a diminuição na quantidade de eosinófilos após a competição em consideração neste estudo também está de acordo com a literatura [[KRATZ et al., 2002](#); [WU et al., 2004](#)]. O aumento na quantidade de plaquetas pode ser consequência de desidratação, de resposta a uma fase aguda da lesão tecidual por repetição de esforço físico [[SIEGEL et al., 2001](#); [KRATZ et al., 2006](#)] ou também por desaceleração da agregação.

A diminuição observada no número de células vermelhas é um achado comum e poderia ser explicada por lesão mecânica [[WU et al., 2004](#)] e/ou oxidativa [[SZYGULA Z, 1990](#)]. Esta alteração estaria associada com o fato da renovação das células para resistir às deformações pelo estresse de cisalhamento exigir a ocorrência de lise [[JORDAN et al., 1998](#)]. A ausência de variação nos índices hematimétricos VCM, HCM, CHCM e RDW está em acordo com outros estudos reportados na literatura [[YUSOF et al., 2007](#); [ZALCMAN et al., 2007](#)].

A elevação observada no número de neutrófilos poderia estar associada à produção de radicais livres que degradariam o tecido muscular, com maior saída de enzimas musculares como a CK e LDH para o sangue [[CANNON et al., 1990](#); [PIZZA et al., 1995](#)]. De fato, houve elevação da atividade de CK total, CKMB e LDH ao final da corri-

da. Embora essas alterações sejam trivialmente associadas à ocorrência de lesão muscular pelo exercício [TOTSUKA et al, 2002; SAYERS & CLARKSON, 2003], elas também poderiam ocorrer por aumento do efluxo em decorrência de esforços de repetição de movimentos excêntricos envolvendo grande massa muscular [NEUBAUER et al., 2008], o que poderia justificar a menor elevação percentual relativa observada nos níveis séricos daquelas enzimas.

A elevação nas atividades de ALT e AST deve estar relacionada aos danos às células do músculo esquelético, mas também àquelas do fígado [PRIEST et al.,1982; YAO et al., 2003], que também sofre uma enorme sobrecarga de atividade em exercícios extenuantes, pois é o fígado que vai promover a gliconeogênese a partir do ácido láctico formado no músculo.

Conclusão

Os exercícios de ultraduração com momentos de alta intensidade e privação de sono e descanso promoveram aumento do estresse, lesões musculares, diminuição na quantidade de células vermelhas e alterações no sistema imunitário que podem prejudicar o estado de saúde e o rendimento esportivo dos atletas.

Referências

- BERGLUND B, McKENZIE D. Injuries in canoeing and kayaking. In: RENSTROM PAFH, ed. **Clinical practice of sports injury prevention and care**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994:633–640.
- BISHOP NC, BLANNIN AK, ARMSTRONG E, RICKMAN M, GLEESON M. Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. **Med Sci Sports Exerc**. 2000; 32(12): 2046-2051.
- BISHOP NC, WALKER GJ, SCANLON GA, RICHARDS S, ROGERS E. Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion. **Med Sci Sports Exerc**. 2006, 38(3): 513-519.
- BISHOP NC, WALSH NP, SCANLON GA. Effect of prolonged exercise and carbohydrate on total neutrophil elastase content. **Med Sci Sports Exerc**. 2003, 35(8): 1326-1332.
- BLANNIN AK, ROBSON PJ, WALSH NP, CLARK AM, GLENNON L, GLEESON M. The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. **Int J Sports Med**. 1998, 19(8): 547-552.
- BONIFAZI M, SARDELLA F, LUPO C. Preparatory versus main competition: differences in performances, lactate responses and pre – competition plasma cortisol concentrations in elite male swimmers. **Eur J Appl Physiol**. 2000, (5-6): 368-373.
- BORTOLINI MJS, AGOSTINI G, REIS IT, LAMOUNIER RPMS, ESPINDOLA F S. Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. **Res Q Exerc Sport**. 2009, 80(3): 604-610.
- CANNON JG, ORENCOLE SF, FIELDING RA, MEYDANI M, MEYDANI SN, FIATARONE MA, BLUMBERG JB, EVANS WJ. Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. **Am J Physiol**. 1990, 259(6 Pt 2): 1214-1219.
- CHATARD JC, ATLAOUI D, LAC G, DUCLOS M, HOOPER SE, MACKINNON L. Cortisol, DHEA, Performance and training in elite swimmers. **Int J Sports Med**. 2002, 23(7): 510-515.
- DAVISON G, GLEESON M. The effect of 2 weeks vitamin C supplementation on immunoenocrine responses to 2.5 h cycling exercise in man. **Eur J Appl Physiol**. 2006, 97(4): 454–461.
- FEHRENBACH E, SCHNEIDER ME. Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. **Sports Med**. 2006, (36)5: 373–384.
- FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L. M. **Patologia Clínica veterinária**, 2ª. ed., Belo Horizonte: Editora Rabelo, 1982. 293p.

- GATULLO D, PAGLIARO P, LINDEN RJ, MERLETTI A, LOSANO G. The role of nitric oxide in the initiation and in the duration of some vasodilators responses in the coronary circulation. **Pflugers Arch**. 1995, 430(1): 96-104.
- GLEESON M. Immune function in sport and exercise. **J Appl Physiol**. 2007, 103(2): 693–699.
- GORDIS EB, GRANGER DA, SUSMAN EJ, TRICKETT PK. Asymmetry between salivary cortisol and alpha-amylase reactivity to stress: relation to aggressive behavior in adolescents. **Psychoneuroendocrinology**. 2006, 31(8): 976 – 987.
- GRANGER DL, TAINTOR RR, BOOCKAVAR KS, HIBBS JBJR. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. **Methods**. 1995, 7(1): 78-83.
- IWAMOTO J, PENDERGAST DR, SUZUKI H, KRASNEY JA. Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans. **Respir Physiol**. 1994, 97(3): 334-345.
- JORDAN J, KIERNAN W, MERKER HJ, WENZEL M, BENEKE R. Red cell membrane skeletal changes in marathon runners. **Int J Sports Med**. 1998, 19(1): 16-19.
- KRATZ A, LEWANDROWSKI KB, SIEGEL AJ, CHUN KY, FLOOD JG, VAN COTT EM, LEE-LEWANDROWSKI E. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. **Am J Clin Pathol**. 2002, 118(6): 856-863.
- KRATZ A, WOOD MJ, SIEGEL AJ, HIERS JR, VAN COTT EM. Effects of marathon running on platelet activation markers : direct evidence for in vivo platelet activation. **Am J Clin Pathol**. 2006, 125(2): 296-300.
- KRONISCH RL. Mountain biking injuries: fitting treatment to the causes. **Phys Sportsmed**. 1998, 26(3): 65–70.
- KRZYWKOWSKI K, PETERSEN EW, OSTROWSKI K, LINK-AMSTER H, BOZA J, HALKJAER-KRISTENSEN J, PEDERSEN BK. (2001) Effect of glutamine and protein supplementation on exercise-induced decreases in salivary IgA. **J Appl Physiol**. 2001,91(2): 832-838.
- LEVADA-PIRES AC, FONSECA CER, HATANAKA E, ALBA-LOUREIRO T, D'ANGELO A, VELHOTE FB, CURI R, PITHON-CURI TC. The effect of an adventure race on lymphocyte and neutrophil death. **Eur J Appl Physiol**. 2010, 109(3): 447–453
- MACKINNON LT, JENKINS DG. Decreased salivary immunoglobulins after intense interval exercise before and after training. **Med Sci Sports Exerc**. 1993, 25(6): 678-683.
- MALM C. Exercise immunology: the current state of man and mouse. **Sports Med**. 2004, 34(9): 555–566.
- NATALE VM, BRENNER IK, MOLDOVEANU AI, VASILIOU P, SHEK P, SHEPHARD RJ. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. **Sao Paulo Med J**. 2003, 121(1): 9-14.

- NATER UM, ROHLER N, GAAB J, BERGER S, JUD A, KIRSCHBAUM C, EHLERT U. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. **Int J Psychophysiol.** 2005, 55(3): 333-342.
- NEUBAUER O, KÖNIG D, WAGNER KH. Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. **Eur J Appl Physiol.** 2008. 104(3): 417-426.
- NIEMAN DC, NEHLSSEN-CANNARELLA SL, MARKOFF PA, BALK-LAMBERTON AJ, YANG H, CHRITTON DB, LEE JW, ARABATZIS K. The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. **Int J Sports Med.** 1990, 11(6): 467-473.
- NIEMAN DC. Is infection risk linked to exercise workload? **Med Sci Sports Exerc.** 2000, 32(7): 406-411.
- NIEROP A, BRATSIKAS A, KLINKENBERG A, NATER UM, ZIMMERMANN R, EHLERT U. Prolonged salivary cortisol recovery in second-trimester pregnant women and attenuated salivary alpha-amylase responses to psychosocial stress in human pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab.** 2006, 91(4): 1329–1335.
- OLIVEIRA V N, BESSA A, LAMOUNIER R P M S, SANTANA M G, MELLO M T, ESPINDOLA F S. Changes in the salivary biomarkers induced by an effort test. **Int J Sports Med.** 2010, 31(6): 377-381.
- PANOSSIAN AG, OGANESSIAN AS, AMBARTSUMIAN M, GABRIELIAN ES, WAGNER H, WIKMAN G. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. **Phytomedicine.** 1999, 6(1): 17-26.
- PEAKE JM, SUZUKI K, WILSON G, HORDERN M, NOSAKA K, MACKINNON L, COOMBES JS. Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. **Med Sci Sports Exerc.** 2005, 37(5): 737–745.
- PEDERSEN BL, HOFFMAN-GOETZ L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol Rev.** 2000, 80(3): 1055–1081.
- PERSSON MG, WIKLUND NP, GUSTAFSSON LE. Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. **Am Rev Respir Dis.** 1993, 148(5): 1210-1214.
- PFEIFFER RP, KRONISCH RL. Offroad cycling injuries. An overview. **Sports Med.** 1995, 19(5): 311–325.
- PIZZA FX, MITCHELL JB, DAVIS BH, STARLING RD, HOLTZ RW, BIGELOW N. Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. **Med Sci Sports Exerc.** 1995, 27(3): 363-370.
- PRIEST JB, OEI TO, MOOREHEAD WR. Exercise-induced changes in common laboratory tests. **Am J Clin Pathol.** 1982, 77(3): 285-289.

- RANJAN V, XIAO Z, DAMOND SL. Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 1995, 269(2): 550-555.
- SAYERS S P, CLARKSON PM. Short-Term immobilization after eccentric Exercise. Part II: Creatine Kinase and Myoglobin. **Med Sci Sports Exerc**. 2003, 35(5): 762-768.
- SIEGEL AJ, STEC JJ, LIPINSKA I, VAN COTT EM, LEWANDROWSKI KB, RIDKER PM, TOFLER GH. Effect of marathon running on inflammatory and hemostatic markers. **Am J Cardiol**. 2001, 88(8): 918-920.
- SILVA DA, GERVASIO AM, SOPELETE MC, ARRUDA-CHAVES E, ARRUDA LK, CHAPMAN MD, SUNG SS, TAKETOMI EA. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Ann Allergy Asthma Immunol**. 2001, 86: 545-550.
- STEERENBERG PA, VAN ASPEREN IA, VAN NIEUW AMERONGEN A, BIEWENGA A, MOL D, MEDEMA GJ. Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. **Eur J Oral Sci**. 1997, 105(4): 305-309.
- SUNG BH, LOVALLO WR, PICOMB GA, WILSON MF. Effects of caffeine on blood pressure response during exercise in normotensive healthy young men. **Am J Cardiol**. 1990, 65: 909-913.
- SUZUKI K, NAKAJI S, YAMADA M, LIU Q, KURAKAKE S, OKAMURA N, KUMAE T, UMEDA T, SUGAWARA K. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. **Med Sci Sports Exerc**. 2003, 35(2): 348-355.
- SZYGULA, Z. Erythrocytic system under the influence of physical exercise and training. **Sports Med**. 1990, 10: 181-197.
- TESSITORE A, MEEUSEN R, PAGANO R, BENVENUTI C, TIBERI M, CAPRANICA L. Effectiveness of active versus passive recovery strategies after futsal games. **J Strength Cond Res**. 2008, 22(5): 1402-1412.
- TOTSUKA, M. NAKAJI S, SUZUKI K, SUGAWARA K, SATO K. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. **J Appl Physiol**. 2002, 93(4): 1280-1286.
- VANNI DS, HORSTMANN B, BENJO AM, DAHER JPL, KANAAN S; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **J Bras Patol Med Lab**. 2007, 43(3): 181-189.
- VAN STEGEREN A, ROHLER N, EVERAERD W, WOLF OT. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. **Psychoneuroendocrinology**. 2006, 31(1): 137 – 141.
- VAN VEEN JF, VAN VLIET IM, DERIJK RH, VAN PELT J, MERTENS B, ZITMAN FG. Elevated alpha-amylase but not cortisol in generalized social anxiety disorder. **Psychoneuroendocrinology**. 2008, 33(10): 1313 – 1321.

WALSH NP, MONTAGUE JC, CALLOW N, ROWLANDS AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. **Arch Oral Biol.** 2003; 49(2):149-154.

WALLIS JP. Nitric oxide and blood: a review. **Transfusion Med.** 2005, 15(1): 1-11.

WALSH N, BISHOP N, BLACKWELL J, WIERZBICKI S, MONTAGNE J. Salivary IgA Response to Prolonged Exercise in a Cold Environment in Trained Cyclists. **Med Sci Sports Exerc.** 2002, 34(10): 1632-1637.

WU HJ, CHEN KT, SHEE BW, CHANG HC, HUANG YJ, YANG RS. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. **World J Gastroenterol.** 2004, 10(18): 2711-2714.

YAO HW, LI J, JIN Y, ZHANG YF, LI CY, XU SY. Effect of leflunomide on immunological liver injury in mice. **World J Gastroenterol.** 2003; 9(2): 320-323.

YUSOF A, LEITHAUSER RM, ROTH HJ, FINKERNAGEL H, WILSON MT, BENEKE R. Exercise-induced hemolysis is caused by protein modification and most evident during the early phase of an ultraendurance race. **J Appl Physiol.** 2007, 102(2): 582-586.

ZALCMAN I, GUARITA HV, JUZWIAK CR, CRISPIM CA, ANTUNES HK, DWARDS B, TUFIK S, de MELLO MT. Nutritional status of adventure racers. **Nutrition.** 2007, 23(5): 404–411.

CAPÍTULO 4

INFLUÊNCIA DO CALOR SOBRE BIOMARCADORES SALIVARES DE ESTRESSE E IMUNIDADE EM EXERCÍCIO FÍSICO ATÉ A FADIGA

Influência do calor sobre biomarcadores salivares de estresse e imunidade em exercício físico até a fadiga

Romeu Paulo Martins Silva^{a,b,c}, Cristiano Lino Monteiro Barros, Thiago Teixeira Mendes, Pâmella Ferreira Rodrigues^a, Emerson Silami Garcia^d, Nilson Penha-Silva^{a,*}

^aInstitute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^bFederal University of Acre, Cruzeiro do Sul, AC, Brazil

^cUniversitary Center of the Araxá Plateau, Araxá, MG, Brazil

^dFederal University of Minas Gerais, School of Physical Education, Physiotherapy and Occupational Therapy, Belo Horizonte, Brazil

*Correspondence: N. Penha-Silva, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

Resumo

Introdução: Várias modalidades esportivas são realizadas em condições térmicas que podem influenciar no desempenho dos atletas. **Objetivo:** Verificar a influência do exercício no calor sobre o sistema imunitário e o nível de estresse por meio de biomarcadores da saliva (IgA, α -amilase, cortisol, óxido nítrico e proteínas totais) e do sangue (lactato). **Métodos:** A amostra foi composta por nove homens jovens, estudantes de Educação Física ($24,2 \pm 2,5$ anos; $74,99 \pm 7,40$ kg; $178,7 \pm 4,0$ cm; $48,07 \pm 4,63$ mL•kg⁻¹•min⁻¹) que realizaram um teste progressivo máximo em cicloergômetro, dentro de uma câmara ambiental, em duas situações: quente (temperatura seca de 40 °C; T40) e temperada (temperatura seca de 22 °C; T22), ambas com 50% de umidade relativa do ar. Tanto T22 quanto T40 iniciaram com uma potência de 60 W e tiveram acréscimos de 15 W a cada três minutos. Amostras de sangue e saliva foram coletadas simultaneamente antes e após cada teste. **Resultados:** Antes do exercício não houve

diferenças significantes nos níveis dos biomarcadores na saliva nem de lactato no sangue dos atletas entre os dois ambientes térmicos. Mas após os exercícios, houve aumento significativo em todos eles tanto a 22 quanto a 40 °C. Entretanto, não houve diferença significativa entre os níveis de IgA entre os dois ambientes térmicos, mas os níveis de α -amilase, cortisol, óxido nítrico e proteínas totais na saliva foram maiores a 40 que a 22 °C, enquanto os níveis de lactato no sangue foram menores no ambiente quente que no termoneutro. **Conclusão:** A condução dos exercícios no ambiente quente elevou os níveis de estresse, sem alterar a imunidade da saliva.

Palavras-chave: Saliva, Calor, Estresse, Imunidade, Exercício

Introdução

A atividade física pode levar a um ajuste homeostático dos sistemas corporais para que o atleta suporte as novas condições energéticas, bioquímicas e termorreguladoras apresentadas durante o exercício. Esse ajuste será maior de acordo com o tipo do exercício, duração, intensidade [AKIMOTO et al., 2003; FERREIRA et al., 2010; WALSH et al., 2011], nível de treinamento [VIITALA et al., 2004; KWAK et al., 2006] e condições ambientais [LAING et al., 2005]. A análise de componentes salivares como proteínas totais, α -amilase, imunoglobulina A (IgA), óxido nítrico (NO) e cortisol pode representar uma maneira não invasiva de determinar a relação da intensidade, duração, temperatura, umidade do ar e tipo de exercício com as alterações que estas situações poderiam provocar no sistema imunitário e no estresse físico do atleta [LAING et al., 2005; NEUBAUER et al., 2008; BORTOLINI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010].

Vários estudos, em diferentes situações, têm analisado os efeitos do exercício físico sobre os níveis de IgA salivar, os quais poderiam aumentar [BLANNIN et al., 1998], diminuir [WALSH et al., 2002] ou mesmo não sofrer variação alguma [BISHOP et al., 2000]. Mas a ocorrência de diminuição nos níveis de IgA salivar após a realização de exercício físico levaria a um aumento na vulnerabilidade a infecções do trato respiratório superior (ITRS) [NIEMAN e CANNARELLA-NEHLSSEN, 1991]. De fato, baixos níveis de IgA salivar foram associados a maior incidência de ITRS [ROSSEN et al. 1970; ISAACS et al. 1984]. A secreção salivar forma uma importante linha de defesa primária contra patógenos invasores da cavidade oral, sendo que a saliva proporciona um efeito de lavagem mecânica e a IgA tem efeito contra replicação de vírus e bactérias na superfície da mucosa oral [MACKINNON e HOOPER, 1994; DOWD, 1999]. Isso significa que a análise da variação dos níveis de IgA na saliva após exercícios físicos pode estimar a vulnerabilidade do atleta a sofrer ITRS.

A atividade da α -amilase salivar é regulada pelo sistema simpático adrenal, por meio da ação da norepinefrina sobre as glândulas salivares. A atividade da α -amilase salivar aumenta após exercícios realizados em cicloergômetro [OLIVEIRA et al., 2010], esteira [GILMAN et al., 1979] e corrida [STEERENBERG ET al., 1997]. O estresse físico e

psicológico gerado pelo exercício estimula a liberação do hormônio glicocorticóide cortisol pela glândula suprarrenal [KIRWAN et al., 1988; GOODWIN et al., 1992], podendo levar a alterações de humor e redução no desempenho do atleta [KIRWAN et al., 1988; NEUBAUER et al., 2008], pois o aumento no cortisol está ligado a diminuição na ação cerebral da serotonina, por diminuição dos RNAs mensageiros que codificam para a síntese do receptor daquele neurotransmissor [PARIANTE et al., 2001]. Este estado de aumento do cortisol e diminuição na ação da serotonina afeta domínios cognitivo como atenção, percepção, memória e processamento emocional [ERICKSON et al., 2003]. Isso significa que a análise dos níveis de α -amilase e de cortisol na saliva seriam bons parâmetros para estimar o estresse induzido pelo exercício [NEUBAUER et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010].

Os níveis de lactato no sangue são utilizados para determinar a intensidade crítica de tolerância ao exercício físico ou mesmo para avaliar o nível de treinamento do atleta [WASSERMAN e MCILROY, 1964; SVEDAHL e MACINTOSH, 2003]. As variações na concentração de lactato no sangue durante e após a realização do exercício físico têm forte correlação com as mudanças na concentração de proteínas totais na saliva [BORTOLINI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010]. Esse aumento nos níveis salivares de proteínas totais durante a atividade física é decorrente de ativação do sistema nervoso simpático [CHICHARRO et al., 1998; WALSH et al., 2004] e, por isso, deve expressar também o grau de estresse induzido pelo exercício.

Exercícios de longa duração, como corridas, ciclismo e triátlon, podem expor o atleta a ambientes com diferentes temperaturas, o que poderia prejudicar seu desempenho. O objetivo do presente estudo foi comparar as alterações ocorridas na imunidade e no nível de estresse gerado pelo exercício físico em ambiente quente (40 °C) em relação a um ambiente temperado (22 °C) pela análise de biomarcadores salivares e de lactato sanguíneo.

Material e métodos

Amostra

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP 355/05) e respeitou todas as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional da Saúde (Res. 196/96) acerca de pesquisas envolvendo seres humanos. Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Exercício, localizado no Centro de Excelência Esportiva da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais. Os participantes assinaram um termo de consentimento e livre esclarecimento. A população deste estudo foi composta por 9 homens (idade $24,2 \pm 2,5$ anos, massa corporal $74,99 \pm 7,40$ kg; estatura $178,7 \pm 4,0$ cm; % gordura $13,6 \pm 5,8\%$; $VO_{2\text{ máx}}$ $48,07 \pm 4,63$ mL·kg⁻¹·min⁻¹).

O número de voluntários foi escolhido com base na amostra de estudos prévios que analisaram a máxima fase estável do lactato (MFEL). Foi adotado como critério de inclusão que os indivíduos apresentassem $VO_{2\text{ máx}}$ entre 40 e 60 mL·kg⁻¹·min⁻¹. Inicialmente foi realizada uma avaliação física para a caracterização da amostra. Nesta avaliação foram realizadas as medidas de massa corporal, estatura e dobras cutâneas. A massa corporal (kg) foi medida com os voluntários descalços e nus, utilizando-se uma balança digital (Filizola®) com precisão de 0,02 kg, previamente calibrada. A estatura (cm) foi medida utilizando-se um estadiômetro com precisão de 0,5 cm, acoplado a uma balança (Filizola®). As dobras cutâneas subescapular, tríceps, peitoral, subaxilar, suprailíaca, abdominal e da coxa foram medidas utilizando-se um plicômetro (Lange®) graduado em milímetros, o que permitiu o cálculo do percentual de gordura, de acordo com a equação proposta por [Jackson e Pollock \[1978\]](#).

Procedimentos

Todos os voluntários realizaram dois exercícios progressivos máximos, um em ambiente quente e outro em ambiente temperado.

Os testes foram realizados com no mínimo cinco dias de intervalo para minimizar qualquer tipo de adaptação (treinamento) ao longo do experimento, e sempre no

mesmo horário do dia para se evitar influências decorrentes do ritmo circadiano. A vestimenta foi padronizada para todas as situações experimentais. Os voluntários foram instruídos a não ingerir bebida alcoólica ou bebida contendo cafeína e nem realizar atividade física vigorosa 24 horas antes do experimento. Também foi requisitado que os voluntários ingerissem 500 mL de água duas horas antes do experimento para garantir que iniciariam os testes hidratados (ACSM, 1996).

Protocolo do exercício progressivo (teste)

Posteriormente, foram realizados, de forma aleatória, dois exercícios progressivos máximos dentro de uma câmara ambiental (Russels®) em duas situações experimentais: quente (temperatura seca de 40 °C) (T40) e temperada (temperatura seca de 22 °C) (T22), ambas com umidade relativa do ar (URA) de 50%. Os testes iniciavam-se com uma potência correspondente a 60 W e a cada três minutos eram acrescidos 15 W até a fadiga voluntária. A cadência foi mantida fixa em 60 rpm. A potência pico (WPico22 e WPico40) foi calculada de acordo com a equação proposta por [Kuipers et al. \[1985\]](#): $WPico = W1 + (W2 \cdot t / 180)$, sendo que W1 é a potência correspondente ao último estágio completo, W2 é a potência correspondente ao incremento de carga de cada estágio e t é o tempo em segundos de duração do estágio incompleto. As variáveis ergo-espirométricas foram medidas continuamente durante o teste. A FC foi anotada a cada minuto e ao final de cada estágio do teste, bem como ao final do teste. O voluntário classificava seu esforço a partir de chamada Escala de Percepção Subjetiva de Esforço de 15 pontos, na qual 6 representa o menor e 20 o maior esforço [[BORG, 1982](#)]. Amostras de saliva e 25 µL sangue foram coletadas do lobo da orelha antes do início do exercício (rest) e um (ex) e cinco (post) minutos após o exercício para posterior análise da lactatemia.

Os critérios para interrupção dos testes foram: 1) solicitação de interrupção do exercício pelo voluntário; 2) não manutenção da cadência pré-determinada; 3) temperatura retal durante o exercício com valor igual ou superior a 39,5 °C; 4) nota igual a 20 na escala de Percepção Subjetiva do Esforço; 5) ocorrência de tontura, confusão mental, palidez, cianose, náuseas e/ou sinais de insuficiência circulatória periférica; e 6) detecção de qualquer problema em alguns dos equipamentos.

Durante a realização dos exercícios, a temperatura retal (Tr) foi monitorada continuamente e registrada a cada minuto, sendo considerada um indicador da temperatura interna (Ti). A mesma foi medida por meio de uma sonda retal descartável (Yellow Springs, OH; 4491-E) inserida cerca de 11 centímetros além do esfíncter anal. A temperatura da pele (Tp) também foi monitorada continuamente por um termossensor de pele (Yellow Springs, OH) colocado sobre o peito do atleta e registrada a cada minuto. Tanto a sonda retal quanto o termossensor eram ligados a um teletermômetro digital, graduado na escala Celsius (Yellow Springs, OH).

Os voluntários foram pesados nus antes e após a realização do exercício e a taxa de sudorese total foi calculada pela diferença na massa corporal, relativizada pela área de superfície corporal e dividida pelo tempo de exercício.

Foi recomendado aos voluntários que ingerissem pelo menos 500 mL de água duas horas antes dos testes (ACSM, 1996) para garantir o estado de euidratação, caracterizado por valor de gravidade específica da urina menor ou igual a 1,030 g/cm³ [ARMSTRONG, 2000]. A densidade urinária foi medida antes do início e após a realização dos exercícios com a utilização de refratômetro (JSCP, Uridens®, São Paulo, SP, Brasil) previamente calibrado com água destilada. Foi recomendado aos voluntários que mantivessem suas dietas habituais e anotassem o teor das refeições realizadas na noite anterior e no desjejum do dia do teste.

Análise salivar

Antes da coleta da saliva, os voluntários realizaram assepsia oral para limpeza de debris celulares e outras impurezas. A salivação foi estimulada pela mastigação de um tablete de parafilm (Parafilm™) com peso de 0,5 g. A mastigação do tablete foi realizada de forma natural e pessoal, sem a preocupação com velocidade, força e frequência da mastigação. A coleta da saliva iniciava-se imediatamente após o teste e o tempo de coleta era cronometrado em 1 minuto. As amostras de saliva foram colocadas em mini-tubos pré-resfriados (4 °C), preparados e armazenados a -20 °C para a análise de α -amilase, proteínas totais, óxido nítrico, IgA e cortisol. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A análise da atividade da α -amilase 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).

A dosagem de proteínas totais foi feita pelo método colorimétrico do biureto (UCFS DIASYS™, Alemanha), com leituras de absorvância a 604 e a 700 nm (Autoanalyser Architect c8000, Abbot™, IL, USA).

A dosagem de óxido nítrico salivar foi feita pelo método colorimétrico de [Granger et al. \[1995\]](#), com leitura de absorvância a 570 nm em leitora de microplaca (Titer-tek multiskan plus MK11). Os dados foram analisados por meio do aplicativo Microplate Manager version 4.0 (Bio-Rad Laboratories, USA).

A análise da IgA total foi feita por uma adaptação do teste de ELISA [[MACKINNON et al., 1993](#); [SILVA et al., 2001](#)]. Placas de poliestireno (Maxi-Sorp, Nunc, Wohlen) foram sensibilizadas com anticorpo anti-IgA humano (Sigma Chemical, Buchs) diluído na concentração ideal em tampão carbonato, 0,06 M (pH 9,6) por 12 horas a 4 °C. As placas foram lavadas e bloqueadas com tampão específico de dicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD). As amostras de saliva foram diluídas a partir de 1:2 em 1% tampão BSA-PBS e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, foi acrescentado conjugado biotinilado anti-IgA marcado com peroxidase. O substrato enzimático H₂O₂ foi incubado com tampão cromógeno (OPD) à temperatura ambiente por 1 hora. Para análise individual das placas, os resultados foram expressos em índices ELISA (IE). Os valores de densidade óptica (DO) a 405 nm foram determinados em leitora de microplaca. Após obtenção das concentrações de IgA, elas foram divididas pela concentração de proteínas totais na saliva para obtenção dos valores de IgA específica. A dosagem de cortisol foi feita por Kit comercial (Salimetrics, USA), com determinação da densidade óptica a 450 nm em leitor de ELISA.

Análises sanguíneas

Após assepsia local foram coletados 25 μ L de sangue arterial do lóbulo da orelha, utilizando-se capilares de vidro contendo heparina. As amostras de sangue foram transferidas para micro-tubos contendo 50 μ L de fluoreto de sódio a 1% e armazena-

das a -20 °C para a análise de lactato. As dosagens de lactato foram feitas em duplicata por método eletro-enzimático em analisador automático (YSI 1500 Sport L-lactate analyser, USI Inc, Yellow Spring, Ohio, EUA).

Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Os resultados obtidos foram estatisticamente comparados por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, com a utilização do aplicativo GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significantes quando p foi menor que 0,05.

Resultados

Em ambos os ambientes térmicos (22 e 40 °C) houve alteração nos valores dos biomarcadores salivares analisados na condição pós-exercício, tanto a um (ex) quanto a cinco minutos (post) pós-exaustão em relação à condição de repouso (rest).

Embora as concentrações de IgA tenham aumentado com o exercício em ambos os ambientes ($p < 0,05$), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os ambientes tanto em rest quanto em ex e post ($p > 0,05$) e nem alterações entre os tempos de um (ex) e cinco minutos (post) após o teste ($p > 0,05$) (**Figura 4.1**).

As atividades de α -amilase salivar não foram diferentes entre P22 e P40 no estado de repouso ($p > 0,05$), mas se elevaram com o exercício em ambos os ambientes ($p < 0,05$), com maiores valores em T40 que em T22 ($p < 0,05$) tanto a um quanto a cinco minutos após o exercício, porém sem variação significativa entre esses dois momentos em ambas as temperaturas ($p > 0,05$) (**Figura 4.2**).

Os níveis de cortisol salivar não foram diferentes entre T22 e T40 no estado de repouso ($p > 0,05$), mas aumentaram após o teste em ambos os ambientes, com valores significativamente mais elevados em P40 que em T22 em cada momento (1 e 5 min) após o teste ($p < 0,05$), contudo sem variação significativa entre esses dois momentos em ambas as temperaturas ($p > 0,05$) (**Figura 4.3**).

As concentrações de NO na saliva também não foram diferentes entre os dois ambientes no estado de repouso ($p > 0,05$), mas aumentaram com o exercício e foram maiores em T40 que em T22 tanto a um quanto a cinco minutos após o teste, sem variação significativa entre esses dois momentos em ambas as temperaturas ($p > 0,05$) (**Figura 4.4**).

As concentrações de proteínas totais na saliva não apresentaram diferenças entre os ambientes no estado de repouso ($p > 0,05$), mas aumentaram após o teste em ambos os ambientes, tendo sido significativamente maiores em T40 que em T22 ($p < 0,05$) (**Figura 4.5**).

Os níveis de lactato no sangue também não foram diferentes entre os dois ambi-

entes no estado de repouso ($p>0,05$), mas aumentaram após o exercício, quando foram significativamente mais elevados em T22 que em T40 ($p<0,05$), embora sem alteração significativa de um para cinco minutos após o exercício em ambos os ambientes ($p>0,05$) (**Figura 4.6**).

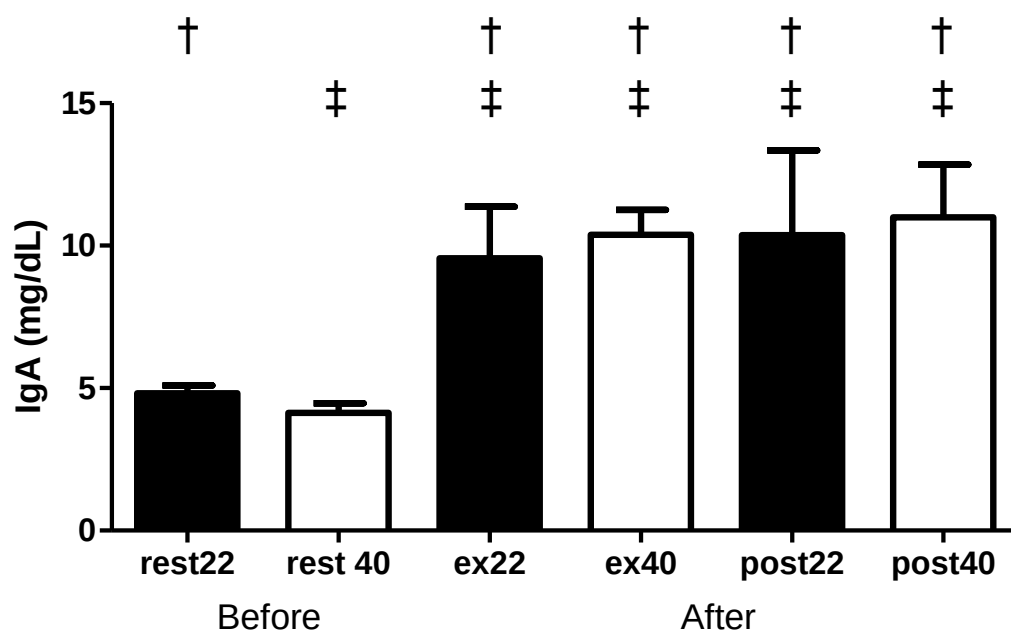


Figura 4.1. Concentrações salivares de IgA antes (rest), um (ex) e cinco minutos após a exaustão (post) nas temperaturas de 22 e 40 °C. † e ‡ indicam exclusivamente comparações feitas com rest22 e rest40, respectivamente (ANOVA, pós-teste de Tukey). Comparações marcadas com o mesmo símbolo indicam que os valores foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

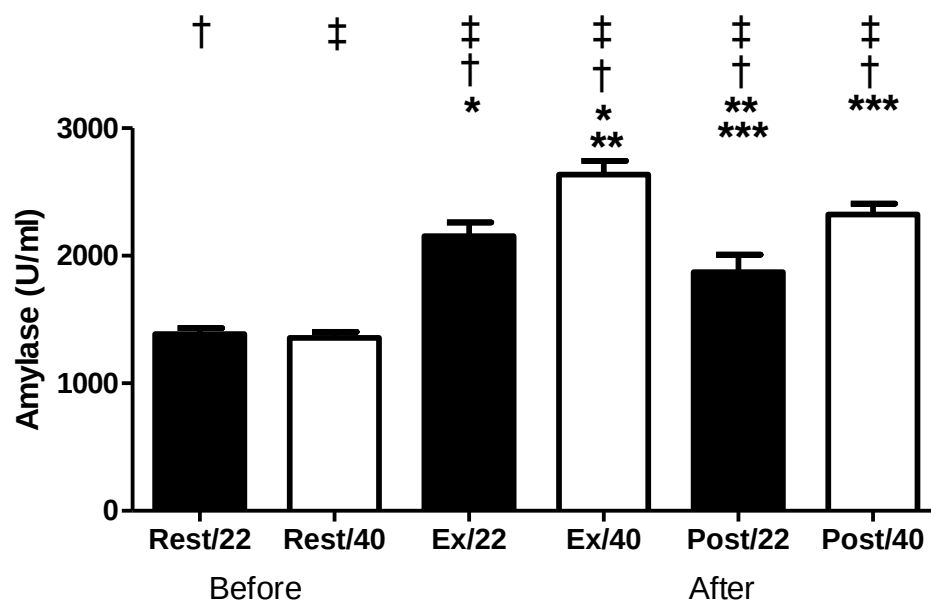


Figura 4.2. Atividades salivares de α -amilase antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C. †, ‡, *, ** e *** indicam comparações feitas com rest22, rest40, ex22, ex40 e post22, respectivamente (ANOVA, pós-teste de Tukey). Comparações marcadas com o mesmo símbolo indicam que os valores foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

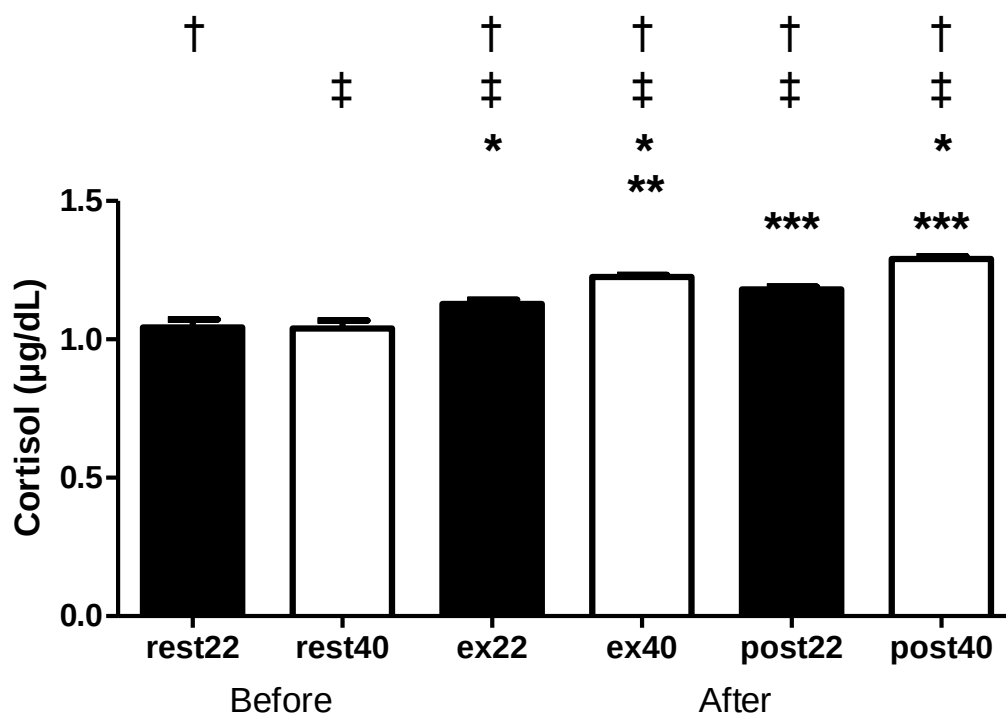


Figura 4.3. Concentrações salivares de cortisol antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C. †, ‡, *, ** e *** indicam comparações feitas com rest22, rest40, ex22, ex40 e post22, respectivamente (ANOVA, pós-teste de Tukey). Comparações marcadas com o mesmo símbolo indicam que os valores foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

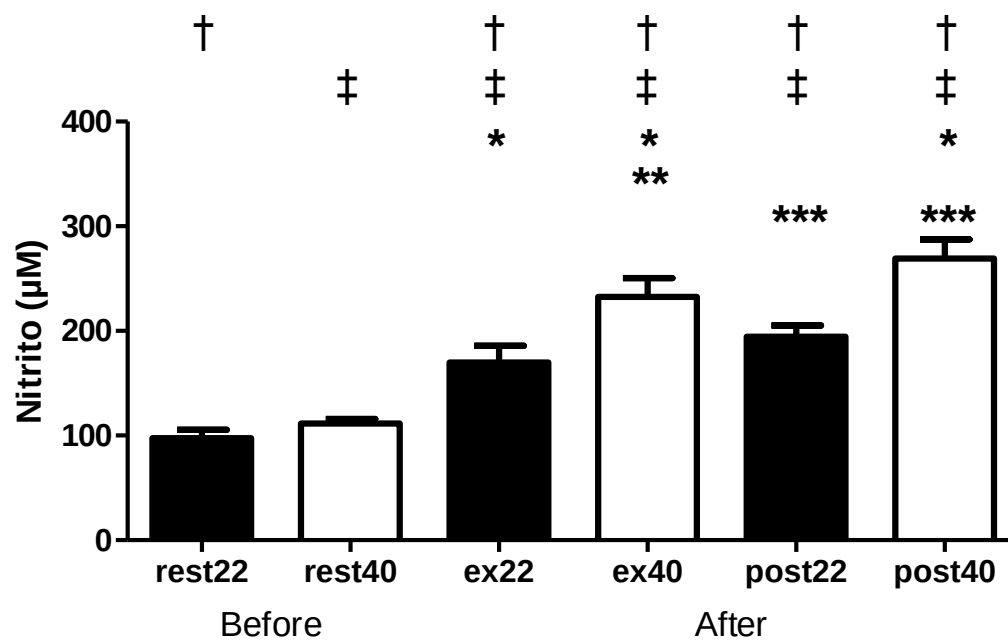


Figura 4.4. Concentrações salivares de óxido nítrico antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C. †, ‡, *, ** e *** indicam comparações feitas com rest22, rest40, ex22, ex40 e post22, respectivamente (ANOVA, pós-teste de Tukey). Comparações marcadas com o mesmo símbolo indicam que os valores foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

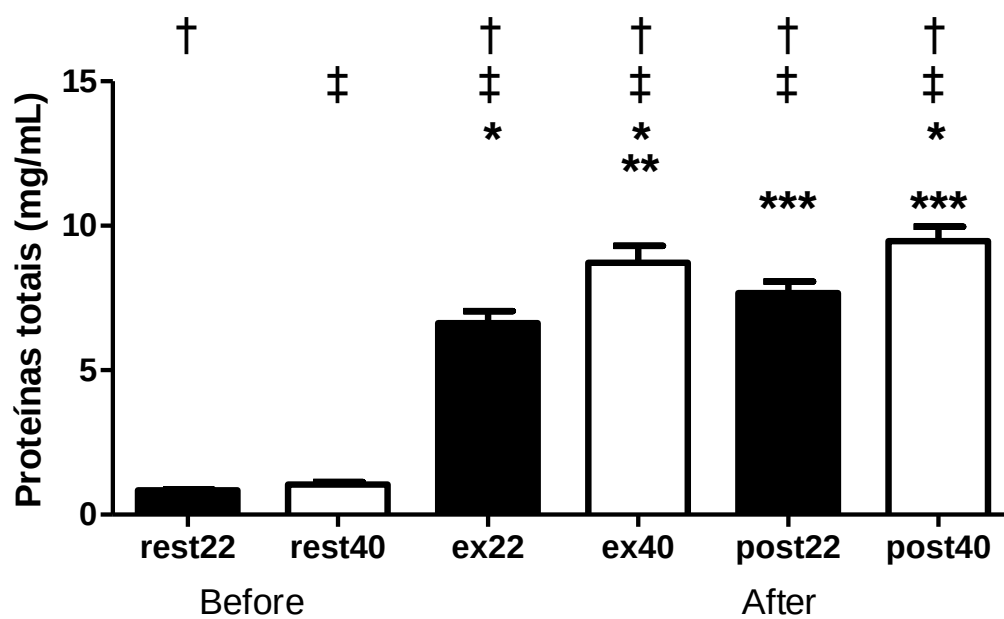


Figura 4.5. Concentrações de proteínas totais salivares antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C. †, ‡, *, ** e *** indicam comparações feitas com rest22, rest40, ex22, ex40 e post22, respectivamente (ANOVA, pós-teste de Tukey). Comparações marcadas com o mesmo símbolo indicam que os valores foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

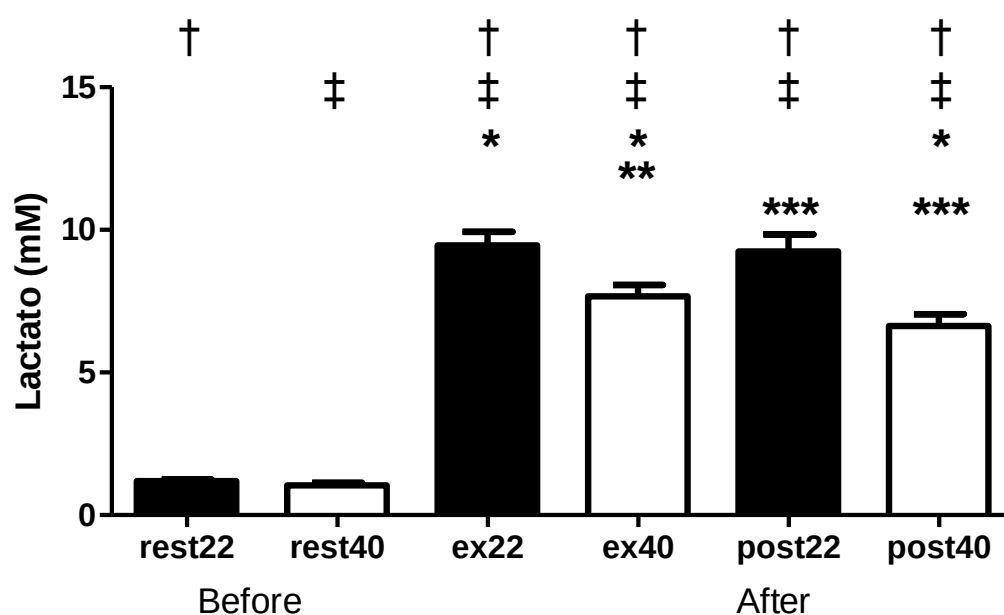


Figura 4.6. Concentrações de lactato sanguíneo antes (rest), um (ex) e cinco minutos (post) após a exaustão nas temperaturas de 22 e 40 °C. †, ‡, *, ** e *** indicam comparações feitas com rest22, rest40, ex22, ex40 e post22, respectivamente (ANOVA, pós-teste de Tukey). Comparações marcadas com o mesmo símbolo indicam que os valores foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

Discussão

Os resultados deste estudo mostraram a ocorrência de aumento significativo dos níveis de IgA na saliva após a realização de exercícios progressivos máximos, sem influência das temperaturas ambientes consideradas (22 e 40 °C) (**Figura 4.1**). Como os níveis de IgA na saliva são reflexo da capacidade de defesa imune [KRZYWKOWSKI et al., 2001], os resultados do presente estudo mostraram que não houve declínio da capacidade imune da saliva após o exercício realizados tanto a 22 quanto a 40 °C. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que também mostraram aumento nos níveis de IgA após a realização de exercícios progressivos até a exaustão em diferentes intensidades e em um mesmo ambiente térmico [BLANNIN et al., 1998]. No entanto, foi reportada diminuição nos níveis de IgA na saliva em ambiente temperado após a realização de uma competição de triatlão [LIBICZ et al., 2006] e após a realização de exercícios incrementais até a exaustão em ambiente quente ($30,3 \pm 0,1$ °C e 70% de URA) [LAING et al., 2005]. Também foi reportada diminuição nos níveis de IgA após a realização de duas horas de exercícios em cicloergômetro em intensidade de 70% do $VO_{2\text{ máx}}$ em uma temperatura de $-6,4 \pm 0,1$ °C [WALSH et al., 2002]. Tais discrepâncias podem ser decorrentes de diferenças no estado de hidratação dos atletas. No estudo descrito no presente trabalho, o estado de euidratação dos voluntários foi devidamente aferido antes e depois do teste pela análise da gravidade específica da urina, que esteve sempre abaixo de 1,030 [ARMSTRONG, 2000].

Exercícios prolongados em ambientes quentes provocam um estímulo adrenérgico que irá aumentar a atividade simpática, com diminuição do fluxo salivar e consequentemente da secreção de IgA [GALBO et al., 1979; SOLTOFF et al., 2010]. Uma ação semelhante também decorreria de estimulação pelo cortisol [SABBADINI e BERCZI, 1995]. Essas considerações predizem a existência de uma relação inversa entre os níveis de IgA e cortisol, a qual não foi observada no presente trabalho, uma vez que a elevação aqui reportada nos níveis de IgA (**Figura 4.1**) foi associada a elevação nos níveis de cortisol (**Figura 4.3**). Isto concorda com o estudo de Laing et al. [2005], que também não encontraram relação inversa entre os níveis de IgA e cortisol [LAING et al., 2005], porém não de forma absoluta, pois esses autores não encontraram

diferença na concentração de cortisol salivar após exercícios prolongados em cicloergômetro tanto em ambiente temperado quanto quente. Entretanto, o trabalho de Laing et al. [2005] não deve representar uma base de comparação adequada com os resultados descritos neste trabalho, pois a intensidade do exercício naquele estudo foi menor que a aqui utilizada. No presente estudo, os atletas fizeram exercício em carga crescente até a fadiga, enquanto naquele estudo o exercício foi feito em intensidade constante por duas horas.

Apesar das discrepâncias em relação aos trabalhos de Laing et al. [2005], a elevação mais expressiva nos níveis de cortisol na saliva em ambiente quente concorda com outros trabalhos [DAVISON e GLEESON, 2006; NEUBAUER et al., 2008] e deve ser em consequência do maior estresse sistêmico causado pelo calor, podendo levar à redução no desempenho dos atletas.

A ocorrência de maior nível de estresse no ambiente quente deve ter sido o fator responsável pela maior elevação da atividade de α -amilase salivar neste ambiente (Figura 4.2), pois a α -amilase também tem sido usada como biomarcador do nível de estresse gerado pelo exercício [NIEROP et al., 2006; VAN STEGEREN et al., 2006; VAN VEEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010], uma vez que o aumento de sua atividade na saliva durante o exercício decorre de aumento na atividade simpática do receptor β -adrenérgico [CASTLE e CASTLE, 1998; SCHNEIDER et al., 2000].

O maior aumento na concentração sanguínea de lactato no ambiente termoneutro e de proteínas totais salivares no ambiente quente concorda com resultados de estudos executados em ambiente temperado [BORTOLINI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010] e quente [WALSH et al., 2004]. Como o aumento nas proteínas totais da saliva é também consequência de ativação do sistema nervoso simpático [CHICHARRO et al., 1998; WALSH et al., 2004], a ativação desse sistema deve ter sido mais intensa no ambiente quente que no temperado [GALBO et al., 1979].

A elevação dos níveis de NO com o exercício concorda com estudos que mostram um aumento de NO após a realização de diferentes tipos de atividades físicas à temperatura ambiente [PERSSON et al., 1993; IWAMOTO et al., 1994; PANOSSIAN et al., 1999]. O aumento do NO está ligado ao atrito de cisalhamento nos vasos, a partir do

aumento da pressão sistólica [SUNG et al., 1990, GATULLO et al., 1995], por aumento na atividade da óxido nítrico sintase (NOS) proporcionalmente à intensidade do exercício [PERSSON et al.,1993; IWAMOTO et al., 1994; RANJAN et al., 1995]. A maior elevação dos níveis de NO em ambiente quente sugere uma maior atividade da NOS neste ambiente.

Conclusão

O exercício físico até a exaustão aumentou o nível de estresse de forma mais intensa no ambiente quente que no termoneutro, porém sem afetar a imunidade da saliva.

Referências

BISHOP NC, BLANNIN AK, ARMSTRONG E, RICKMAN M, GLEESON M. Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. **Med Sci Sports Exerc** 2000, 32(12): 2046-2051.

BLANNIN AK, ROBSON PJ, WALSH NP, CLARK AM, GLENNON L, GLEESON M. The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. **Int J Sports Med** 1998, 19(8): 547-552.

BORTOLINI MJS, DE AGOSTINI GG, REIS IT, LAMOUNIER RPMS, BLUMBERG JB, ESPINDOLA FS. Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. **Res Q Exerc Sport** 2009, 80(3): 604-610.

CASTLE D, CASTLE A. Intracellular transport and secretion of salivary proteins. **Crit Rev Oral Biol Med** 1998, 9(1): 4-22

CHICHARRO JL, LUCIA A, PEREZ M , VAQUERO AF, URENA R. Saliva composition and exercise . **Sports Med** 1998; 26(1): 17-27.

DAVISON G, GLEESON M. The effect of 2 weeks vitamin C supplementation on immunendocrine responses to 2.5 h cycling exercise in man. **Eur J Appl Physiol** 2006, 97(4): 454-461.

DOWD FJ. Saliva and dental caries. **Dent Clin North Am** 1999, 43(4): 579-597.

ERICKSON K, DREVETS W, SCHULKIN J. Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. **Neurosci Biobehav Rev** 2003, 27(3): 233-246.

FERREIRA CK, PRESTES J, DONATTO FF, VERLENGIA R, NAVALTA JW, CAVAGLIERI CR. Phagocytic responses of peritoneal macrophages and neutrophils are different in rats following prolonged exercise. **CLINICS**. 2010, 65(11): 1167-1173.

GALBO H, HOUSTON ME, CHRISTENSEN NJ, HOLST JJ, NIELSEN B, NYGAARD E, SUZUKI J. The effect of water temperature on the hormonal response to prolonged swimming. **Acta Physiol Scand**. 1979, 105(3): 326-337.

GATULLO D, PAGLIARO P, LINDEN RJ, MERLETTI A, LOSANO G. The role of nitric oxide in the initiation and in the duration of some vasodilator responses in the coronary circulation. **Pflugers Arch**. 1995, 430(1): 96-104.

GILMAN S, THORNTON R, MILLER D, BIRSNER R. Effects of exercise stress on parotid gland secretion. **Horm Metab Res**. 1979, 11(7): 454.

GOODWIN GM, MUIR WJ, SECKL JR, BENNIE J, CARROLL S, DICK H. The effects of cortisol infusion upon hormone secretion from the anterior pituitary and subjective mood in depressive illness and controls. **J Affec Disor** 1992, 26(2): 73-84.

GRANGER DL, TAINTOR RR, BOOCKAVAR KS, HIBBS JBJR. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. **Methods**. 1995, 7(1): 78-83.

ISAACS D, WEBSTER AD, VALMAN HB. Immunoglobulin levels and function in pre-school children with recurrent respiratory infections. **Clin Exp Immunol** 1984, 58(2): 335-340.

IWAMOTO J, PENDERGAST DR, SUZUKI H, KRASNEY JA. Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans. **Respir Physiol** 1994, 97 (3): 334-345.

KIRWAN JP, COSTILL DL, FLYNN MG, MITCHELL JB, FINK WJ, NEUFER PD. Physiological responses to successive days of intense training in competitive swimmers. **Med Sci Sports Exerc** 1988, 20(3): 255-259.

KWAK YS. Effects of training on spleen and peritoneal exudate reactive oxygen species and lymphocyte proliferation by splenocytes at rest and after an acute bout of exercise. **J Sports Sci** 2006, 24(9): 973-978.

LAING SJ, GWYNNE D, BLACKWELL J, WILLIAMS M, WALTERS R, WALSH NP. Salivary IgA response to prolonged exercise in a hot environment in trained cyclists. **Eur J Appl Physiol** 2005, 93(5-6): 665-671.

LIBICZ S, MERCIER B, BIGOU N, LE GALLAIS D, CASTEX F. Salivary IgA response of triathletes participating in the French Iron Tour. **Int J Sports Med** 2006, 27(5): 389-394.

MACKINNON LT, HOOPER S. Mucosal (secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during overtraining. **Int J Sports Med** 1994, 15(3): 179-183.

NASOLODIN VV, GLADKIKH IP. Immunological responsiveness in trained and untrained schoolchildren and students during a school year. **Gig Sanit** 2006, (6):56-59.

NEUBAUER O, KONIG D, WAGNER KH. Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. **Eur J Appl Physiol** 2008, 104(3): 417-426.

NIEMAN DC, NEHLSSEN-CANNARELLA SL. The effects of acute and chronic exercise of immunoglobulins. **Sports Med** 1991, 11(3): 183-201.

NIEROP A, BRATSIKAS A, KLINKENBERG A, NATER UM, ZIMMERMANN R, EHLERT U. Prolonged salivary cortisol recovery in second-trimester pregnant women and atte-

nuated salivary alpha-amylase responses to psychosocial stress in human pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab** 2006, 91(4): 1329-1335.

OLIVEIRA V N, BESSA A, LAMOUNIER R P M S, SANTANA M G, MELLO M T, ESPINDOLA F S. Changes in the salivary biomarkers linduced by an effort test. **Int J Sports Med** 2010, 31(6): 377-381.

PANOSSIAN, A.G., OGANESSIAN, A.S.; AMBARTSUMIAN, M.; GABRIELIAN, E.S.; WAGNER, H.; WIKMAN, G. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. **Phytomedicine** 1999, 6(1): 17-26.

PARIANTE CM, MILLER AH. Glucocorticoid receptors in major depression relevance to pathophysiology and treatment. **Biol Psychiatry** 2001, 49(5): 391-404.

PERSSON MG, WIKLUND NP, GUSTAFSSON LE. Endogenous nitric oxide in single exhalations and the chazige during exercise. **Am Rew Respir** 1993, 148(5): 1210-1214.

RANJAN V, XIAO Z, DAMOND SL. Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 1995, 269(2): 550-555.

ROSSEN RD, BUTLER WT, WALDMAN RH, ALFORD RH, HORNICK RB, TOGO Y, KASEL JA. The proteins in nasal secretion. II. A longitudinal study of IgA and neutralizing antibody levels in nasal washings from men infected with influenza virus. **JAMA** 1970, 211(7): 1157-1161.

SCHNEIDER DA, MCLELLAN TM, GASS GC. Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. **Med Sci Sports Exerc** 2000, 32(3): 608-613

SOLTOFF SP, HEDDEN L. Isoproterenol and cAMP block ERK phosphorylation and enhance $[Ca^{2+}]_i$ increases and oxygen consumption by muscarinic receptor stimulation in rat parotid and submandibular acinar cells. **J Biol Chem** 2010, 285(18): 13337-13348.

STEERENBERG PA, VAN ASPEREN IA, VAN NIEUW AMERONGEN A, BIEWENGA A, MOLD, MEDEMA GJ. Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. **Eur J Oral Sci** 1997, 105(4): 305-309.

SUNG BH, LOVALLO WR, PICOMB GA, WILSON MF. Effects of caffeine on blood pressure response during exercise in normotensive healthy young men. **Am J Cardiol** 1990, 65(13): 909-913.

SVEDAHL K, MACINTOSH BR. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Can J Appl Physiol** 2003, 28(2): 299-323.

VAN STEGEREN A, ROHLER N, EVERAERD W, WOLF OT. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. **Psychoneuroendocrinology** 2006, 31(1): 137-141.

VAN VEEN JF, VAN VLIET IM, DERIJK RH, VAN PELT J, MERTENS B, ZITMAN FG. Elevated alpha-amylase but not cortisol in generalized social anxiety disorder **Psychoneuroendocrinology** 2008, 33(10): 1313-1321.

VIITALA PE, NEWHOUSE IJ, LAVOIE N, GOTTARDO C. The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. **Lipids Health Dis** 2004, 22: 3-14.

WALSH NP, BISHOP NC, BLACWELL J, WIERZBICKI SG, MONTAGUE JC. Salivary IgA response to prolonged exercise in a cold environment in trained cyclists. **Med Sci Sports Exerc** 2002, 34(10): 1632-1637.

WALSH NP, MONTAGUE JC, CALLOW N, ROWLANDS AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. **Arch Oral Biol** 2004, 49(2): 149-154.

WASSERMAN, K, McILORY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am J Cardiol** 1964, 14: 844-852.