

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

**Avaliação de diferentes tipos de treinamento físico sobre o estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos em diabetes mellitus tipo II e o efeito do exercício agudo sobre os biomarcadores salivares em atletas**

Vanessa Neves de Oliveira

Orientador: Foued Salmen Espindola

Uberlândia 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**Avaliação de diferentes tipos de treinamento físico sobre o estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos em diabetes mellitus tipo II e o efeito do exercício agudo sobre os biomarcadores salivares em atletas**

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica, na área de Bioquímica

Vanessa Neves de Oliveira

Orientador: Foued Salmen Espindola

Uberlândia 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

- O48a Oliveira, Vanessa Neves de, 1979-  
Avaliação de diferentes tipos de treinamento físico sobre o estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos em diabetes mellitus tipo II e o efeito do exercício agudo sobre os biomarcadores salivares em atletas / Vanessa Neves de Oliveira. - 2010.  
104 f. : il.
- Orientador: Foued Salmen Espíndola.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.  
1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Teses. 2. Diabetes - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 612.766.1

---

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

Palavras chave – diabetes, estresse oxidativo, exercício, perfil de proteínas, saliva.

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

**Avaliação de diferentes tipos de treinamento físico sobre o estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos em diabetes mellitus tipo II e o efeito do exercício agudo sobre os biomarcadores salivares em atletas**

Vanessa Neves de Oliveira

**Comissão Examinadora**

Presidente: Foued Salmen Espindola (Orientador)

Prof. Dr Herbert Gustavo Simões

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dra Ana Graci Brito Madurro

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dra Denise Vaz Macedo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dra Nadia Carla Cheik

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr Carlos Ueira Vieira

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dra Veridiana de Melo Rodrigues  
Ávila

\_\_\_\_\_  
Assinatura

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

Data da Defesa: 25/02/2010

\_\_\_\_\_  
Foued Salmen Espindola

## DEDICATÓRIA

A minha filha, Jéssica Neves de Oliveira, pois é por ela que tenho forças para enfrentar, superar e vencer os desafios.

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

Ao meu Orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola por acreditar neste trabalho, pelo acompanhamento e diretrizes em todas as suas etapas e pelo convívio acadêmico.

A minha filha Jéssica que soube, a cada dia, do seu jeito ter paciência, maturidade para tolerar minha ausência, entender e dividir-me com os livros e trabalhos, pelas noites em que adormecia me esperando para contar como foi seu dia ou mesmo para dar um beijo de boa noite.

Ao meu pai, meu ídolo, que mesmo de longe se fez presente.

Ao Prof. Dr. Nilson Penha, pelo carinho, pela serenidade, atenção, disponibilidade, gentileza e prontidão sempre que necessitei.

Ao Prof. Antonio Vicente Mundim e ao técnico Felipe Cesar Gonçalves do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária pelo carinho, dedicação, disponibilidade e entusiasmo demonstrado.

A minha amiga, irmã Luciana Karen Calábria pela ajuda incondicional em todos os momentos, pelo ombro, pelos desabafos, pelo apoio e por todas as palavras certas, nas horas exatas.....

Ao meu querido amigo Renato José pela parceria, companhia e apoio fundamental do desenvolvimento deste trabalho, pela agradável companhia que fazia de nossas manhãs, tardes e noites de trabalho passar tão rápidas.

Ao meu amigo, Prof. Alexandre Gonçalves pelo apoio sempre que me foi necessário.

Ao Artur, Miguel, Simone, Tatiane, Renata, Alice, Neire, Leonardo Bruno, ou seja a toda família LABIBI que me acolheram e estiveram sempre dispostos a me ajudar.

A todos os voluntários que se dispuseram a auxiliar no treinamento dos pacientes: Lara, Igor Wells, Vanessa, Miguel, Leonardo, Gederson, Sérgio, Amanda e Maick.

A todos os 48 participantes do projeto pela oportunidade de conhecê-los e me mostrarem que “Viver é a única coisa que não dá para deixar para depois”.

Ao Dr. Paulo Jorge Tannus e sua esposa M<sup>ª</sup> Luiza Mendonça pelo apoio constante e amizade.

Ao meu colega de trabalho e amigo Carivan Cordeiro pelo incentivo e por acreditar em mim mais que eu mesma.

Ao Gerson Fraissat pelos conselhos e pela disponibilidade sempre que precisei.

Aos demais idealizadores, coordenadores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica.



## Sumário

DEDICATÓRIA .....	VI
AGRADECIMENTOS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XI
LEGENDA DE FIGURAS.....	XIII
APRESENTAÇÃO .....	1
CAPÍTULO 1.....	3
1.0- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	3
1.1- Introdução.....	3
1.2- Diabetes, exercício e estresse oxidativo .....	3
1.2.1- Hiperglicemia e estresse oxidativo .....	3
1.2.1.1- Aumento da atividade da via do poliol .....	4
1.2.1.2- Produção intracelular de precursores de produtos finais da glicação avançada.....	5
1.2.1.3- Ativação da PKC .....	7
1.2.1.4- Aumento da atividade da via hexosamina .....	8
1.2.2- Estado antioxidante e estresse oxidativo no sangue de diabéticos.....	9
1.3- Exercício e estresse oxidativo.....	11
1.3.1- Produção de radicais livres e exercício .....	12
1.3.2- Adaptação antioxidante e exercício.....	16
1.4- Exercício no controle metabólico e biomarcadores de estresse oxidativo.....	20
2.0- REFERÊNCIAS .....	24
3.0- ARTIGO CIENTÍFICO.....	36
CAPÍTULO 2.....	58
4.0- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	58
4.1- Introdução.....	58
4.2- Efeito do exercício na secreção e composição salivar .....	59
4.2.1- Taxa de fluxo.....	59
4.2.2- Composição salivar .....	60
4.3- Limiar anaeróbio (LAN).....	62
4.3.1- Biomarcadores salivares do limiar anaeróbio .....	64
4.4- Recomendações metodológicas para coleta da saliva.....	65
4.4.1- Recomendações para a coleta da saliva.....	65
4.4.2- Coleta da saliva (Salivette® e método de cuspe) .....	65

4.4.3- Manipulação e armazenamento de amostras de saliva .....	67
5.0- REFERÊNCIAS .....	68
6.0- ARTIGO CIENTÍFICO.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AMP</b> - Adenosina monofosfato	<b>LV</b> - Limiar ventilatório
<b>AGEs</b> - <i>Advanced glycation end product</i>	<b>MDA</b> - Malonaldeído
<b>ADP</b> - Adenosina difosfato	<b>Mn-SOD</b> - Superóxido dismutase dependente de manganês
<b>ATP</b> - Adenosina trifosfato	<b>MPO</b> - Mieloperoxidase
<b>CAT</b> - Catalase	<b>NADPH</b> - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
<b>CML</b> - Carboximetilisina	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b> - Fator Nuclear kappa $\beta$
<b>CuZn-SOD</b> - Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco	<b>NO</b> - Óxido nítrico
<b>DAG</b> - Diacilglicerol	<b>NOS</b> - Óxido nítrico sintase
<b>DNA</b> - Ácido desoxirribonucléico	<b>O<sub>2</sub></b> - Oxigênio molecular
<b>eNOS</b> - Óxido nítrico sintase endotelial	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> - Ânion radical superóxido
<b>ERNs</b> - Espécies reativas de nitrogênio	<b>OGT</b> - O-GlcNAc transferase
<b>EROs</b> - Espécies reativas de oxigênio	<b>O-GlcNAc</b> - N-acetil glucosamina O ligado
<b>ET-1</b> - Endotelina-1	<b>ONOO<sup>-</sup></b> - Peroxinitrito
<b>GADPH</b> - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<b>OPLA</b> - <i>Onset of plasma lactate accumulation</i>
<b>GFAT</b> - glutamina-frutose-6-fosfato amidotransferase	<b>PARP</b> - Poli (ADP-ribose) polimerase
<b>GLUT-4</b> - Transportador de glicose do tipo 4	<b>PAI-1</b> - Inibidor do ativador do plasminogênio-1
<b>GPDH</b> - glicerol 3-fosfato desidrogenase	<b>PFGA</b> - Produtos finais da glicação avançada
<b>GR</b> - Glutathiona redutase	<b>PKC</b> - Proteína quinase C
<b>GSH</b> - Glutathiona reduzida	<b>PLA2</b> - Fosfolipase A2
<b>GSH-Px</b> - Glutathiona peroxidase	<b>pO<sub>2</sub></b> - Pressão parcial de oxigênio
<b>GSSG</b> - Glutathiona oxidada	<b>RAGE</b> - Receptor para PFGA
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> - Peróxido de hidrogênio	<b>Se-GSH-Px</b> - Glutathiona peroxidase dependente de selênio
<b>HbA1c</b> - Hemoglobina glicada	
<b>HDL</b> - Lipoproteínas de alta densidade	

**HNO<sub>2</sub>** - Ácido nitroso

**HOCl** - Ácido hipocloroso

**HSPs** - *Heat shock proteins*

**Ig** - Imunoglobulina

**IMP** - Inosina monofosfato

**LAN** - Limiar anaeróbio

**LAN<sub>Amy</sub>** - Limiar da alfa amilase  
**LDL** - Lipoproteínas de baixa densidade

**LAN<sub>epi</sub>** - Limiar de epinefrina

**LAN<sub>sa</sub>** - Limiar salivar

**LL** - Limiar de lactato

**SOD** - Superóxido dismutase

**STZ** - Estreptozotocina

**TGF-β** - Fator de crescimento de transformação beta

**TNFα** - Fator de necrose tumoral-α

**TBARS** - Substâncias reativas ao ácido tiobabúrico

**UDP-GlcNAc** - Uridina difosfato N-acetil glucosamina

**VEGF** - Fator de crescimento vascular derivado do endotélio

**VO<sub>2</sub>** - Consumo de oxigênio

**XDH** - Xantina desidrogenase

**XO** - Xantina oxidase

## Legenda de Figuras

Figura 1- Efeito da hiperglicemia na vida do poliol.....	5
Figura 2 - Formação dos produtos finais de glicação avançada.....	6
Figura 3 - Representação esquemática das anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia-induzida.....	8
Figura 4 - Via de sinalização da hexosamina, interferência com os fatores de transcrição.....	9

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados referentes a esta tese estão apresentados em dois capítulos sob a forma de manuscritos.

### **Capítulo 1- Os efeitos de diferentes tipos de treinamento físico no estado antioxidante, estresse oxidativo e controle metabólico de diabéticos tipo II.**

A maioria das complicações do diabetes é atribuída aos danos decorrentes do desbalanço redox desencadeado pela elevação do nível de glicose no sangue. O exercício físico tem sido muito recomendado na profilaxia e tratamento do diabetes; entretanto, dependendo da modalidade, intensidade e duração do exercício físico a produção das espécies reativas formadas durante o processo, somadas àquelas inerentes ao estado patológico, contribui ainda mais para o desbalanço redox e os sistemas antioxidantes podem ser insuficientes para proteger os tecidos contra os danos oxidativos. Assim, a determinação de substâncias envolvidas no binômio, antioxidante – pró-oxidante revela-se de grande importância, com perspectivas de aplicação clínica para o diagnóstico de doenças e do estado geral de saúde do indivíduo. Além disso, o conhecimento de como o diabético responde frente às diferentes tipos de treinamento de exercício para tentar manter o balanço redox do meio e se essas respostas são suficientes para minimizar o estresse oxidativo é de fundamental importância para os especialistas em ciências da saúde, em ciências química e bioquímica, em nutrição, e, principalmente, do público em geral.

### **Capítulo 2- Alterações em biomarcadores salivares induzidas por teste de esforço**

A saliva humana é indicadora da resposta fisiológica de diferentes tecidos e sistemas e usada como ferramenta de diagnóstico. Na prática de exercícios este fluido altera seu fluxo e composição e estas variações parecem ser úteis no controle da intensidade do exercício uma vez que os níveis de eletrólitos, a atividade da  $\alpha$ -amilase salivar e concentração de proteína total se comportam de forma semelhante ao lactato no sangue. A determinação do limiar anaeróbio é valioso na avaliação da aptidão física em atletas, crianças, pacientes com doenças cardíacas e /ou pulmonares. Assim, surgiu a necessidade de estabelecermos parâmetros mais acessíveis na determinação do limiar anaeróbio

uma vez que a prática de exercício tem sido extensamente usada como uma ferramenta na prevenção e tratamento de doenças crônico-degenerativas. Além disso, nenhum trabalho relacionando o uso da saliva como um método indireto na prescrição da intensidade do exercício observou as alterações no perfil das proteínas salivares durante um teste de esforço máximo. Assim o objetivo deste estudo foi analisar o efeito de um teste de esforço incremental no perfil de proteínas salivares para determinar se alguma proteína específica foi alterada em resposta ao exercício. Além disso, determinamos os limiares de proteína total e  $\alpha$ -amilase salivar e de lactato sanguíneo e verificamos a correlação existente entre eles. Este trabalho foi aceito para publicação na revista *International Journal of Sports Medicine* (fator de impacto 1.626).

Os artigos se encontram no item **Artigo Científico**. As seções **Materiais e Métodos**, **Resultados**, **Discussão** e **Referências**, encontram-se nos próprios artigos e representam o estudo na íntegra. As **Referências** de cada Capítulo referem-se somente às citações que aparecem no item **Fundamentação Teórica** uma vez que o manuscrito possui suas próprias referências.

## **CAPÍTULO 1**

### **1.0- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **1.1- Introdução**

No diabetes mellitus a hiperglicemia decorrente da ausência ou da baixa secreção de insulina ou da resistência a mesma, é responsável por inúmeros efeitos sobre a célula e seus constituintes. A hiperglicemia provoca alterações celulares decorrentes do processo de glicação não enzimática e da glicoxidação. Estes processos estão relacionados a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e a formação de produtos finais da glicação avançada (PFGA ou AGEs [do inglês, *Advanced glycation end product*]), que contribuem para a modificação irreversível de proteínas, DNA e lipídios. O exercício físico também é um potente candidato na formação de EROs dependendo da sua intensidade e duração. Por outro lado, o desbalanço redox temporário induzido pelo aumento das EROs é capaz de promover aumento das defesas antioxidantes pois o sistema antioxidante celular aumenta sua atividade para manter o equilíbrio redox da célula. Entretanto, poucos trabalhos abordam o efeito de diferentes tipos de treinamento sobre o estresse oxidativo no diabetes. A questão acerca do assunto é “Qual modalidade de exercício favorece o controle metabólico e minimizam os danos decorrentes dos eventos hiperglicêmicos e/ou oscilações glicêmicas presentes em pacientes diabéticos tipo II?” Assim, este trabalho demonstra a resposta das principais enzimas antioxidantes, estresse oxidativo e controle metabólico induzido por diferentes tipos de treinamento (aeróbico, resistido e combinado) realizado durante 12 semanas em diabéticos tipo II.

#### **1.2- Diabetes, exercício e estresse oxidativo**

##### **1.2.1- Hiperglicemia e estresse oxidativo**

Crescentes evidências indicam que o aumento na produção e/ou sequestro inefetivo das EROs são cruciais na determinação de danos teciduais. Assim, vários trabalhos têm focado no estado antioxidante e estresse oxidativo no diabético tipo II [1-3]. Entretanto, ainda não há um consenso se o estresse



oxidativo é fator primário na patogênese das complicações diabéticas, ou se este é meramente consequência dos danos teciduais, refletindo a presença dessas complicações. Trabalhos que avaliaram o controle do diabetes e suas complicações indicam a hiperglicemia como o fator de risco para as complicações da doença [4]. Portanto, inúmeras hipóteses tentam explicar a origem das complicações oriundas da hiperglicemia, com 1) o aumento do fluxo pela via dos polióis, gerando estresse oxidativo [5]; 2) o aumento dos PFGA gerando aumento de glicação de proteínas plasmáticas e da matriz extra-celular [6]; 3) a ativação da via da proteína quinase C (PKC), gerando aumento de citocinas, estresse oxidativo e fatores proliferativos [7]; e 4) o aumento do fluxo pela via das hexosaminas [8]. Segundo Bayners e Thorpe a lista é longa talvez porque cada hipótese seja um reflexo diferente de um mesmo mecanismo patogênico, ou talvez porque diferentes tecidos sejam sensíveis a diferentes mecanismos [4].

#### **1.2.1.1- Aumento da atividade da via do poliol**

A via do poliol tem a aldose redutase como a enzima restritiva, que normalmente tem a função de reduzir aldeídos tóxicos na célula em álcoois inativos. Entretanto, quando a concentração de glicose na célula torna-se extremamente elevada, a aldose redutase reduz a glicose a sorbitol, que é posteriormente convertido à frutose, resultando aumento da relação  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (Figura 1). A maior proporção de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  nestas células leva a condições similares de hipoxia, designada de “pseudohipoxia” [9, 10]. Tais mudanças no estado redox e a perturbação metabólica podem originar estresse osmótico nas células microvasculares, devido ao aumento dos níveis de sorbitol intracelular [9], alterações em outras vias de transdução de sinal em consequência do aumento da produção de metilglioxal (espécies reativas de carbonilas) e diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da proteína quinase C (PKC). A baixa concentração de  $\text{NADPH}$  atenua a atividade da glutatona redutase (GR) e o nível da forma reduzida da glutatona diminui, resultando numa redução da atividade glutatona peroxidase e em um nível maior de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [11].

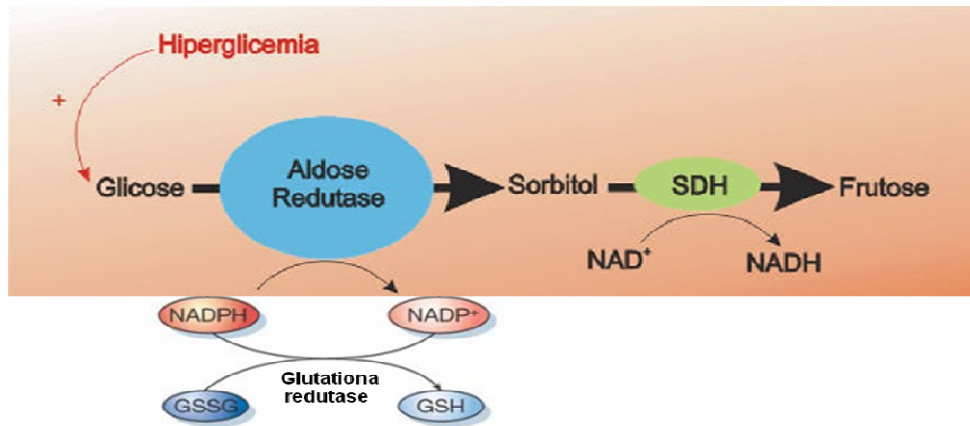


Figura 1- Efeito da hiperglicemia na vida do poliol. Fonte: Adaptado de Brownlee 2001.

Numerosos inibidores da enzima aldose redutase foram desenvolvidos como possíveis agentes terapêuticos nas complicações dos diabéticos. Embora estes inibidores sejam eficazes em modelos experimentais, a eficácia clínica não tem sido demonstrada de uma maneira consistente [12]. Engerman e Kern estudaram o efeito destes inibidores em cães diabéticos tratados durante cinco anos e observaram que a velocidade de condução nervosa em cães diabéticos diminuiu ao longo do tempo, como acontece em humanos [13]. Por outro lado, Brownlee relatou que o defeito induzido pelo diabetes na velocidade da condução nervosa foi prevenido com o uso desses inibidores [10].

### 1.2.1.2- Produção intracelular de precursores de produtos finais da glicação avançada

Os PFGA constituem uma grande variedade de moléculas formadas a partir de interações aminocarbonilo, de natureza não enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucléicos (Figura 2). Devido à complexidade e à heterogeneidade das reações que podem ocorrer apenas poucos PFGA foram claramente identificados e podem ser quantificados em estudos laboratoriais. A carboximetilisina (CML), a pirralina e a pentosidina são exemplos de PFGA bem caracterizados e amplamente estudados [14, 15].

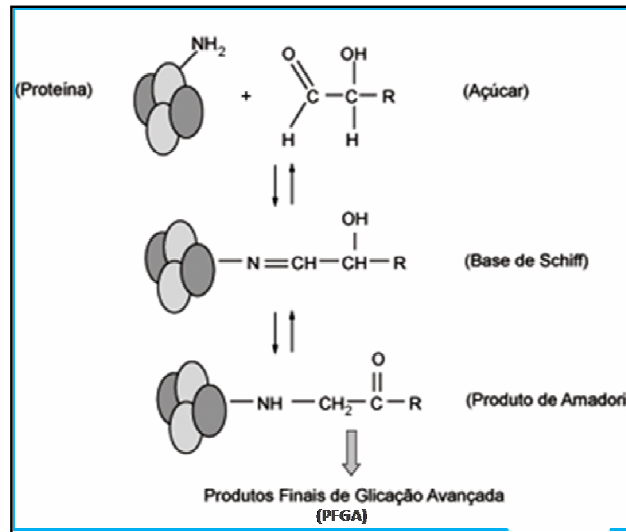


Figura 2 – Formação dos produtos finais de glicação avançada.  
Adaptado de Ahmed 2005.

Nas células, os PFGA são responsáveis por uma série de alterações como a perda de função pelas proteínas alteradas [16], modificação de compostos da matriz extracelular [17], aumento da produção de EROs ou ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B devido à sua interação com receptores celulares [18]. No diabetes, a interação de proteínas modificadas pelos PFGA com as células endoteliais normais inicia uma ação deletéria na homeostase da parede vascular. Há aumento da permeabilidade vascular, redução da ação anticoagulante da trombosmodulina, aumento da síntese de fator tecidual procoagulante e aumento da síntese de moléculas de adesão celular. Trabalhos usando inibidores de PFGA com animais demonstraram uma parcial inibição de manifestações diabéticas como doenças microvasculares na retina, rins e nervos [19]. Entretanto, a correlação direta dos diferentes tipos de PFGA na patogênese das complicações diabéticas é ainda pouco conhecida. Surpreendentemente, nenhum produto de glicação avançada foi claramente associado a um efeito biológico específico no plano molecular ou celular<sup>14</sup>. Têm-se apenas algumas associações indiretas como, por exemplo, o fato de os níveis séricos da CML estarem aumentados em pacientes diabéticos com retinopatia, embora esse efeito não seja observado naqueles com nefropatia. Sabe-se também que os níveis plasmáticos de pentosidina são altos em ambos os grupos.

Uma vez formados, os PFGA são produtos estáveis e irreversíveis. Apesar de constituírem um largo número de estruturas químicas, os PFGA predominantes *in vivo* são as proteínas de carboximetilisina. Com a idade, os

PFGA acumulam-se nas proteínas das paredes vasculares, a uma velocidade acelerada no diabetes. O grau de glicosilação não enzimática é determinado principalmente pela concentração de glicose e pelo tempo de exposição a elevadas glicemias. Outro fator crítico na formação dos PFGA é o potencial redox do microambiente tecidual. Situações predisponentes a um potencial oxidativo predominante também levam a formação aumentada dos PFGA [20].

PFGA-proteínas são proteínas quimicamente danificadas. Assim como acontece com outras moléculas danificadas, DNA oxidado ou lipoproteínas, os mecanismos biológicos evoluíram para o seu reconhecimento e entendimento no que se refere aos processos de síntese de degradação. Receptores de PFGA ligados a superfície da célula foram identificados e parece que desempenham um papel na absorção e catabolismo de PFGA -proteínas no plasma, membranas de eritrócitos e na matriz extracelular. Destes receptores, os melhores caracterizados são os RPFGA (receptores para PFGA) [21]. Os RPFGA são amplamente distribuídos entre os diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais, células musculares lisas e macrófago. Os níveis dos PFGA parecem aumentar nos rins, tecido vascular e pele de animais diabéticos algumas semanas após a indução do diabetes em modelos animais [20], sugerindo que os PFGA são formados em uma fase inicial da doença e que o aumento dos seus níveis é sistêmico.

#### **1.2.1.3- Ativação da PKC**

A hiperglicemia aumenta a síntese do DAG, que é um co-fator crítico para ativar as isoformas  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\delta$  da PKC [22, 23]. Vários trabalhos mostraram que a hiperglicemia no diabetes estimula o aumento da produção de EROs pela NADPH-oxidase, por intermédio da PKC [24, 25]. Essa quinase, por sua vez, é de grande importância na sinalização intracelular e é responsável pela fosforilação das subunidades citoplasmáticas da NADPH oxidase e com isso leva a ativação desse complexo enzimático [26] que passa a produzir EROs. Giugliano e colaboradores mostraram em seus trabalhos a existência da associação entre a produção aumentada de EROs, por meio da PKC, com o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares como aterosclerose, retinopatia e hipertensão no diabetes [27].

Além disso, a ativação da PKC desencadeia em uma variedade de efeitos sobre a expressão gênica levando aos vários efeitos maléficos, como: diminuição na produção de óxido nítrico (NO) e atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) [28], aumento na produção do vasoconstritor endotelina-1 (ET-1), do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e do fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF), NFkB e NADPH-oxidase [22, 29] (Figura 3).

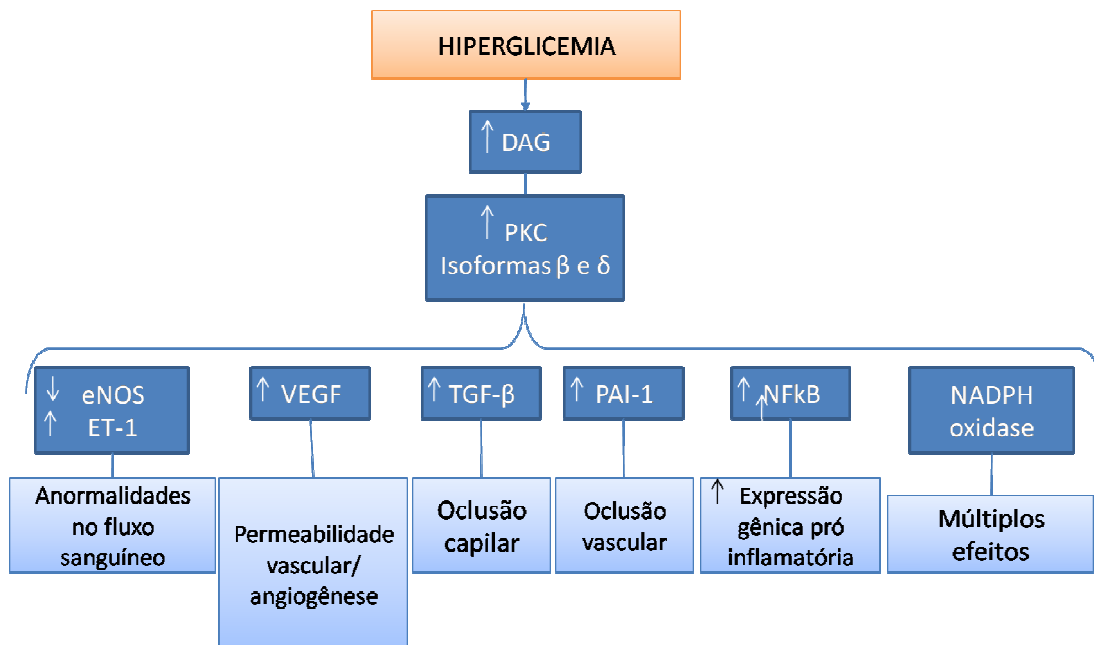


Figura 3 - Representação esquemática das anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia-induzida.

#### 1.2.1.4- Aumento da atividade da via hexosamina

Quando a concentração de glicose está alta dentro da célula, a maioria desta glicose é metabolizada através da glicólise. Entretanto, parte da frutose-6-fosfato produzida desta reação é desviada para uma via de sinalização na qual a enzima glutamina-frutose-6-fosfato amidotransferase converte a frutose-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato e finalmente a UDP (uridina difosfato) N-acetil glucosamina (UDP-GlcNAc) [10]. Posteriormente, N-acetil glucosmina liga-se aos resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição, cuja modificação por glucosamina resulta em mudanças patológicas na expressão gênica [30, 31], como um aumento na produção de PAI-1 e no TGF- $\beta$  [32] (Figura 4). Ainda que

esta via tenha sido recentemente reconhecida, existem evidências que esta desempenhe papel significativo nas anormalidades induzidas por hiperglicemia na expressão gênica de células glomerulares (33), disfunção dos cardiomiócitos [33] e modificações nas proteínas das células endoteliais da carótida de diabéticos tipo II [34].

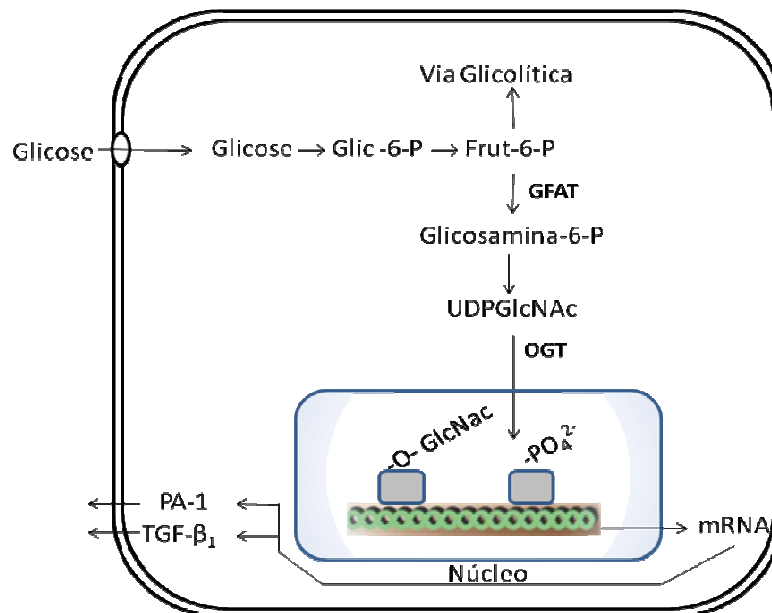


Figura 4 – Via de sinalização da hexosamina Interferência com os fatores de transcrição. Fonte: Adaptado de Brownlee, 2001.

O fato de pacientes tratados com drogas que bloqueiam a formação de um desses mecanismos não terem como resultado a prevenção completa das complicações crônicas levou Brownlee em 2005 a propor um mecanismo unificador [10]. Este está representado pelo aumento de estresse oxidativo na mitocôndria induzido pelo aumento da glicose intracelular, o qual leva à quebra das fitas do DNA nuclear, que ativa a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). Esta enzima modifica a atividade de uma enzima-chave da via glicolítica, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), reduzindo sua atividade, o que ativa a via poliol, aumentando a formação dos PFGA, ativando a PKC e aumentando o fluxo pela via das hexosaminas.

### 1.2.2- Estado antioxidante e estresse oxidativo no sangue de diabéticos

Muitos procedimentos para avaliar o conteúdo total de antioxidantes em misturas complexas, tais como os fluidos biológicos, estão agora disponíveis.

O sangue humano é uma excelente fonte de marcadores *in vivo* de estresse oxidativo, uma vez que nele são transportados e redistribuídos antioxidantes e endobióticos modificados por ação de EROs e espécies reativas do nitrogênio (ERNs). É considerado uma amostra biológica única, de fácil obtenção e isolamento, e potencialmente mais informativa, já que, obtida de um indivíduo, pode descrever seu estado de saúde no momento da coleta [35].

A atividade eritrocítica das enzimas antioxidantes de diabéticos tipo II são controversas. Alguns trabalhos relatam elevada atividade da enzimas superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (CuZn-SOD) assim como os altos níveis de peroxidação lipídica associada com baixa atividade da glutathiona peroxidase dependente de selênio (Se-GSH-Px) [36] enquanto que outros relatam baixa atividade da (CuZn-SOD) e elevada atividade da CAT nestes pacientes. Além disso, diabéticos com complicações microvasculares apresentam baixa atividade tanto da SOD quanto da GSH-Px [37]. Entretanto existe um consenso de que os diabéticos apresentam prejuízo no sistema de defesa antioxidantes sendo potencialmente suscetíveis ao desenvolvimento de danos oxidativos [36-38].

Aydin e colaboradores verificaram o efeito do controle glicêmico sobre parâmetros oxidativos e controle metabólico de diabéticos tipo II e concluíram que o tratamento hipoglicêmico melhora os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) e glicemia de jejum mas não reverte completamente os danos nos lipídios de membrana [36]. A avaliação do poder antioxidante do plasma do diabético no balanço oxi-redutor demonstrou uma significativa redução na capacidade antioxidante do plasma e, ao mesmo tempo, um aumento significativo nos marcadores de peroxidação lipídica nos pacientes diabéticos quando comparado com os não diabéticos [39]. Por outro lado, Marra e colaboradores demonstraram que a capacidade antioxidante do plasma das mulheres diabéticas é significativamente menor que a dos homens diabéticos [40]. Além disso, as taxas de ácido úrico no plasma dos pacientes diabéticos e, principalmente nas mulheres diabéticas, também foram significativamente menores, possivelmente devido à lesão renal associada. Assim, sugere-se que as baixas concentrações de uréia no plasma, consequência da hiperglicemia e que causa um aumento na sua excreção, seja um dos responsáveis pela redução da capacidade antioxidante do plasma em diabéticos, podendo ser uma explicação para a maior suscetibilidade das mulheres diabéticas a complicações cardiovasculares.

Em indivíduos diabéticos, mesmo sem complicações crônicas, o nível de glutathiona reduzida (GSH) nos eritrócitos é menor, provavelmente devido ao estresse oxidativo ou pela diminuição da glutathiona redutase (GR) [41, 42]. O resultado acerca dos níveis de GSH no fígado de diabéticos é contraditório. De acordo com Choudhary e colaboradores, os níveis de GSH dos hepatócitos são baixos [43], enquanto que no estudo de Grant e Duthie foi detectado um aumento de 20% comparado com os não diabéticos [44].

Estudos realizados por Matkovic e colaboradores demonstraram que ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) apresentam menor atividade da SOD no fígado, rins, baço, coração e eritrócitos após 2 meses [45]. Em outro estudo verificaram que aos cinco dias de indução do diabetes com STZ os ratos já apresentavam queda na atividade da SOD nos eritrócitos e na retina. Eritrócitos humanos contêm SOD glicada e não glicada, mas a porcentagem de SOD glicada, que apresenta menor atividade, é maior nos eritrócitos de ratos diabéticos quando comparada com os eritrócitos normais [46]. As alterações da SOD observadas nos eritrócitos de diabéticos parecem ser dependentes da idade do paciente, da severidade da doença e do controle glicêmico. Assim, a progressão do diabetes pode causar alterações nos níveis de GSH e na atividade das enzimas antioxidantes de forma sistêmica, contribuindo para o aparecimento de complicações em indivíduos portadores da doença [47].

### **1.3- Exercício e estresse oxidativo**

Depois de mais de duas décadas de intensa pesquisa, sabe-se que a manutenção da homeostase oxidativa é crítica para a sobrevivência e função normal da célula [1]. No entanto, no domínio da bioquímica dos radicais livres, um paradigma ainda continua a instigar pesquisadores e pessoas comuns: “Se o exercício promove a produção de EROs, por que deveríamos continuar a incentivar o público a participar no exercício?”. Sabemos também que as defesas antioxidantes podem ser moduladas por exercícios crônicos e agudos; entretanto, quando se trata de indivíduos diabéticos os estudos ainda são controversos sobre o efeito do exercício e as suas modulações.

Assim, para maximizar os benefícios do exercício, é importante compreender o efeito agudo e crônico do exercício físico sobre o estresse oxidativo e defesas antioxidantes no diabetes.



### 1.3.1- Produção de radicais livres e exercício

Durante a atividade muscular, a demanda energética pode superar em 35 vezes a demanda de repouso. Desta forma, durante sua realização ocorre um grande aumento no consumo de oxigênio, na sua maior parte em decorrência do aumento do trabalho muscular [48]. O exercício físico induz o aumento de até 20 vezes no volume de oxigênio total consumido [49] permitindo que o anion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) seja formado de várias maneiras [49-52]. Entretanto, a intensidade do estresse oxidativo é dependente do tipo de exercício. As modalidades esportivas que obtêm energia através do metabolismo aeróbio apresentam mais facilidade de promover a liberação dessas substâncias em comparação com aquelas que obtêm energia através do metabolismo anaeróbio. Com isso, os atletas ligados a modalidades aeróbias sofrem mais as conseqüências da presença de espécies reativas de oxigênio [53]. Além disso, as atividades intensas e de longa duração promovem um maior estresse oxidativo do que as atividades de curta e média duração realizadas em alta intensidade. Estes resultados demonstraram que o exercício físico estimula o estresse oxidativo de forma diferente [54-57], dependendo da sua intensidade e da sua duração [51].

Apesar do estresse oxidativo induzido pelo exercício ser extensamente relatado na literatura e vários mecanismos para a produção das EROs terem sido identificados, as contribuições específicas de cada um deles ainda estão mal caracterizadas. No entanto, parece que a fonte mais importante de radicais livres, tanto em repouso quanto durante o exercício, é um "vazamento" na cadeia respiratória da membrana mitocondrial interna. Vários dos centros redox dos quatro complexos enzimáticos que compõem a cadeia respiratória podem ser oxidados pelo oxigênio molecular, resultando na formação do  $O_2^{\cdot-}$ . Devido à organização da cadeia respiratória, o oxigênio é consumido quase que exclusivamente pelo citocromo c oxidase (complexo IV), cuja estrutura e química redox não permitem o vazamento de  $O_2^{\cdot}$ . Porém, o acoplamento inadequado na transferência de elétrons entre os receptores de elétrons do complexo II e III é responsável pela conversão de 2 a 5% do oxigênio consumido em  $O_2^{\cdot-}$  sob condições de repouso [58, 59].

Isto leva a uma interpretação generalizada de que um aumento substancial na produção de EROs é esperado durante o exercício, já que o fluxo

de oxigênio pelo músculo ativo pode aumentar em até ~100 vezes o valor de repouso para atender à demanda energética. No entanto, estudos *in vitro* realizados por Boveris e Chance mostraram que o “vazamento” de radicais livres da mitocôndria só ocorre em situações de baixo consumo de oxigênio, elevado potencial de membrana e baixa produção de ATP, o que implicaria na diminuição da produção de radicais livres durante o exercício e não no seu aumento [58]. Assim, o estudo de Herrero e Barja confirma a menor produção de radicais em situações de maior consumo de oxigênio e produção de ATP [60]. Por outro lado, observou-se que durante o exercício aeróbio a pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) citosólica é constante, porém a  $pO_2$  mitocondrial diminui [61, 62], e provavelmente essa diminuição seria a responsável pelo incremento de EROs induzido pelo exercício e não o maior fluxo de oxigênio [63]. Altos níveis de EROs foi comprovado em estudos sob condições de hipóxia [64] e com o exercício isométrico, que não exige grandes aumentos no  $VO_2$ , mas reduz a  $pO_2$  mitocondrial [62, 65].

Além dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, outras enzimas mitocondriais, como a glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPDH) podem contribuir ainda mais para aumento de EROs induzidas pelo exercício. A atividade da GPDH é regulada por níveis de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) [66], que aumentam com o exercício físico [67]. O aumento da atividade GPDH correlaciona-se com o aumento na produção de  $H_2O_2$  dependente de glicerol-3-fosfato [68]. Atualmente, não se sabe sobre a relevância dessa enzima na produção de EROs induzidas pelo exercício em humanos. Além disso, o aumento induzido pelo exercício na concentração de  $Ca^{+2}$  pode ativar a enzima fosfolipase A2 (PLA2). Esta enzima, localizada no sarcolema, na membrana dos diferentes organelas, no sarcoplasma e no interior dos lisossomas, utiliza os fosfolípidos das membranas para a síntese de ácido araquidônico, o qual é substrato para a ação subsequente da ciclo-oxigenase e da lipo-oxigenase motivando a formação de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e, concomitantemente, EROs [69].

Se, por um lado, a PLA2 parece ter algum papel protetor nas membranas celulares, pela remoção dos hidroperóxidos resultantes da peroxidação lipídica, por outro, os lisofosfolípidos e o ácido araquidônico resultantes da ação desta enzima, têm um efeito detergente nas membranas celulares podendo, assim, motivar a perda da permeabilidade seletiva do sarcolema, favorecendo a perda da homeostasia celular ao  $Ca^{2+}$  e a difusão de

compostos sarcoplasmáticos para o espaço intercelular [70-72]. Este fenômeno poderá explicar a forte correlação, descrita em humanos, entre a concentração sérica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador indireto de peroxidação lipídica, e a atividade plasmática da creatina quinase após situações de exercício agudo exaustivo [73].

Mecanismos similares aos processos de isquemia e reperfusão também são responsáveis pelo aumento das EROs induzidas pelo exercício. O exercício intenso está associado à hipóxia tecidual em diversos órgãos, devido à redistribuição do fluxo sanguíneo para satisfazer as demandas aumentadas de oxigênio para os músculos esqueléticos ativos e pele. Assim, durante exercício realizado em intensidades iguais ou superiores ao  $\text{VO}_2$  máximo, as fibras musculares podem ser submetidas a hipóxia relativa, uma vez que o suprimento de oxigênio não consegue se igualar a demanda energética [74].

O exercício físico também contribui para aumentar a formação de EROS aumentando por elevar a atividade do ciclo de degradação das purinas. Neste ciclo, a adenosina monofosfato (AMP) é desaminada pela enzima adenilato desaminase a inosina monofosfato (IMP), que se acumula no músculo esquelético. Como a IMP não se difunde rapidamente do músculo esquelético durante o exercício intenso, o seu acúmulo pode levá-la a uma via secundária de metabolização, ocasionando a formação de hipoxantina (HX), xantina, ácido úrico,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produtos finais da degradação de adeninas [75, 76].

Além disso, as condições isquêmicas, características de exercícios de alta intensidade ou inabituais, disparam a conversão de xantina desidrogenase (XDH) à xantina oxidase (XO), provavelmente pela quebra da homeostase do cálcio que ativa proteases dependentes de cálcio que catalisam a clivagem de uma porção da XDH [77]. No processo de reoxigenação, a XO produz  $\text{O}_2^{\cdot-}$  como um intermediário da degradação da HX, à xantina e, conseqüentemente, a urato. Especula-se que apesar dos níveis plasmáticos de XO efetivamente aumentarem após o exercício [61-63, 78], o incremento das EROs mediado pela XO seja limitado pelo substrato e não pela enzima [79]. Por outro lado, estudos com alopurinol, inibidor da atividade XO [75, 80], mostraram que esta enzima é uma fonte de EROs após o exercício, e que a produção de EROs por XO pode levar ao estresse oxidativo durante várias horas após o exercício, não se limitando ao músculo esquelético. Para Vollaard e colaboradores, ainda que o incremento na

expressão da XO aconteça predominantemente após o exercício é pouco provável que esse mecanismo seja responsável pela maior produção de EROs durante o exercício [81]. Condições hipóxicas também têm sido mostradas no aumento da atividade da óxido nítrico sintase (NOS), levando à formação de radicais do óxido nítrico que podem exercer um efeito pró-oxidante fraco por eles próprios ou se combinar com o superóxido para formar um oxidante mais potente, o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).

A disfunção microvascular, edema e dano celular provocados por estresse mecânico de cisalhamento resultantes do exercício também aumentam a produção de EROs [82] desencadeando uma resposta inflamatória caracterizada pela infiltração de neutrófilos e outros fagócitos nas áreas afetadas. A mieloperoxidase (MPO), uma enzima que contém ferro e é encontrada em neutrófilos, catalisa a conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). As EROs produzidas por neutrófilos são geradas para destruir bactérias invasoras e remover tecidos danificados. A neutrofilia induzida pelo exercício ocorre como resultado da migração de neutrófilos vindos dos tecidos endoteliais (mediada por catecolaminas) e da medula óssea (mediada pelo cortisol) [83]. Isso faz com que proteínas, células danificadas e também células mortas sejam removidas. Além disso, sabe-se que os níveis de neutrófilos e MPO elevados após o exercício podem permanecer alterados por horas [84, 85] ou dias [86]. Embora isso seja uma reação desejável, quando não bem regulada, pode ser uma das causas de inflamações agudas devido a um grande aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios (interleucina 1, interleucina 8 e  $\text{TNF-}\alpha$ ) e prostaglandinas, levando a indução e intensificação de processo inflamatório adicional, aumentando a produção de EROs, que são ativadores de fator transcrição  $\text{NF-}\kappa\beta$  [87].

Outra teoria sobre o mecanismo de produção de EROs induzidas pelo exercício envolve as proteínas heme [88], como a hemoglobina e mioglobina que contém ferro, capazes de gerar ou remover EROs. A acidose metabólica induzida por exercício intenso pode liberar o ferro da hemoglobina (ou da mioglobina), tornando-o disponível para participar da formação do radical. Nos eritrócitos, esta liberação é acompanhada pela formação de metahemoglobina, principalmente quando os mesmos estão depletados de glutathione reduzida. A liberação do ferro é acompanhada pela peroxidação lipídica da membrana e, como consequência, ocorre hemólise [89, 90]. Por outro lado, o exercício físico de intensidade leve a

moderada tem sido descrito como causador de desbalanço redox temporário [91], e este desbalanço foi recentemente reconhecido como sendo benéfico, pois atua na regulação de mecanismos celulares importantes, tais como a regulação vasomotora, resposta imunológica, adesão celular, proliferação celular, metabolismo, envelhecimento e morte celular [72]. Outro possível mecanismo de formação de EROs durante o exercício pode estar relacionado com a oxidação das catecolaminas circulantes [95, 96].

Mesmo que o exercício induza a uma alteração significativa na produção de EROs, estudos recentes mostram que o exercício físico regular pode tornar mais eficiente o sistema de defesa antioxidante e melhorar a capacidade oxidativa dos sistemas orgânicos, estabelecendo um equilíbrio entre os danos induzidos pelas EROs e os sistemas de reparo antioxidantes [92-94].

### **1.3.2- Adaptação antioxidante e exercício**

O conhecimento sobre a homeostase antioxidante veio inicialmente da observação de que há quase uma combinação perfeita entre a capacidade de defesa antioxidante de um organismo e seu ambiente de vida. O aparecimento de oxigênio na Terra, há cerca de dois bilhões de anos, provocou o desenvolvimento de mecanismos de defesa celular [12].

A defesa das células é feita por substâncias antioxidantes que são capazes de neutralizar os radicais livres, evitando ou diminuindo os danos que estes causam a proteínas, DNA e lipídeos [72]. Esse sistema de defesa pode ser dividido em quatro grupos: I- antioxidantes nutricionais, como o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e o betacaroteno (vitamina A); II- antioxidantes enzimáticos, como o superóxido dismutase, as catalases, glutathione redutase e a glutathione peroxidase; III- antioxidantes solúveis, como a glutathione, o ácido úrico, a albumina, a haptoglobina e a hemopexina; IV- sequestradores de metais de transição, como a transferrina, a lactoferrina, a ferritina, a albumina e a ceruloplasmina.

Os tecidos com uma maior taxa de consumo de oxigênio, como o fígado, o coração e o cérebro, constitutivamente expressam mais enzimas antioxidantes do que aqueles com menor consumo de oxigênio [50]. No músculo, como um órgão altamente heterogêneo, a atividade das enzimas antioxidantes

varia muito em função dos tipos de fibra. Também tem sido reconhecido que os organismos vivos são capazes de induzir o seu sistema de defesa antioxidante através de mecanismos relativamente rápidos para lidar com o estresse oxidativo [97, 98]. A atividade contrátil do músculo já mostrou aumentar significativamente a geração de EROs tanto *in vitro* quanto *in vivo* [51, 99], assim é concebível que a exposição repetida das células a um ambiente altamente oxidativo reaja aumentando a defesa antioxidante do sistema para se proteger contra os danos oxidativos.

Além disso, sabe-se que a demanda de antioxidantes no organismo treinado é maior e se tais necessidades não forem satisfeitas ocorrerão todas as conseqüências do estresse oxidativo. Deste modo, o condicionamento ideal num organismo em treinamento está centrado na adequação bioquímica deste ao estado metabólico imposto pelas condições de esforço. Esta é a condição determinante que pode manter o equilíbrio desejado entre a demanda metabólica e o estresse oxidativo da célula. Além do mais, o treinamento físico mostrou-se capaz de promover o aumento das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, pois melhora a perfusão cardíaca, facilitando o transporte e a incorporação de antioxidantes aos tecidos, além de ativar ou induzir enzimas-chave envolvidas na biossíntese.

Alguns genes antioxidantes também podem ser rapidamente ativados para lidar com o estresse oxidativo causado por infecções agudas, toxinas e distúrbios metabólicos, como o frio, a hipóxia, isquemia, entre outros; enquanto que outros genes são expressos de forma mais lenta, em resposta ao estresse oxidativo crônico, como o envelhecimento, doenças, mudanças ambientais e demandas de energia (como o treinamento de resistência) [100].

Vários autores mostraram um aumento da SOD com o treinamento [50, 101-103]. Porém, quando a atividade das SODs mitocondrial e citoplasmática foram avaliadas após um programa de corrida, observou-se um aumento de 37% da atividade da SOD nas fibras musculares do tipo IIA e 14% nas do tipo IIB, enquanto que nenhuma alteração foi observada para a SOD citoplasmática [104]. Jenkins e colaboradores mediram a CAT e SOD em biopsias do músculo vastolateral humano e encontraram uma correlação significativa entre ambas as enzimas e o  $VO_2$  máximo [50]. Além disso, a associação negativa entre TBARS plasmático e o  $VO_2$  máximo sugere que uma boa aptidão física pode ter um papel

protetor contra o estresse oxidativo. No que se refere a CAT, os estudos não são conclusivos, pois alguns relatam aumento de sua atividade [50, 103] enquanto outros não observaram mudanças ou relataram uma diminuição da mesma após o treinamento [38, 105].

Brady e colaboradores exercitaram ratos em natação até a exaustão e observaram que os níveis de GR diminuíram imediatamente após o exercício [106]. Quando o selênio, cofator da GSH-Px, foi adicionado à dieta dos ratos, houve um aumento da atividade tanto da enzima GSH-Px nos eritrócitos quanto no fígado, porém isto não atenuou o aumento da peroxidação lipídica [107]. Por outro lado, Cesquini e colaboradores verificaram que a atividade da GR, GSH-PX, e SOD e os níveis da GSH nos eritrócitos de ratos que nadaram exaustivamente eram maiores que o grupo controle e relataram que essas adaptações foram capazes de prevenir a peroxidação lipídica nos eritrócitos [108] de homens e mulheres que se exercitaram aerobicamente por 35 minutos durante 8 semanas, aumentaram a atividade da citrato sintase muscular mas nenhuma alteração foi observada no status antioxidante do músculo. Isto sugere que em curto prazo, o treinamento aeróbio aumenta a capacidade de fluxo através do ciclo do ácido cítrico, sem necessariamente aumentar a capacidade de lidar com os radicais livres gerados pelo maior fluxo de elétrons na mitocôndria [109].

Alguns estudos têm demonstrado o aumento de tocoferol no plasma durante o exercício [110, 111], enquanto que outros não mostram o mesmo [112]. Em corredores treinados, encontram-se altos níveis de vitamina E, GSH e a atividade da CAT, quando comparados com corredores menos treinados [113]. Os níveis de vitamina A e C também estão elevados no sangue de indivíduos treinados [114].

Ratos submetidos ao treinamento de resistência aeróbia apresentaram maiores níveis de GSH-Px no coração e no músculo esquelético quando comparado com o grupo controle [103]. É importante ressaltar que o aumento citosólico da GSH-Px, da citrato sintetase e da SOD na célula cardíaca e no músculo esquelético após exercício exaustivo indica que a membrana mitocondrial foi alterada, havendo extravasamento de enzimas.

Além dos antioxidantes descritos acima, Essig e Nosek [115] sugeriram que a síntese de *Heat Shock Proteins* (HSPs) poderia complementar as capacidades de defesa antioxidante do organismo numa situação em que as proteínas intracelulares são danificadas pelos EROS. O músculo esquelético,

devido à sua alta plasticidade e por possuir um complexo metabolismo energético, pode sintetizar HSPs que chegam a constituir cerca de 20% do total de proteínas celulares em condição de estresse [116, 117]. No entanto, os mecanismos moleculares que regulam indução e regulação não foram ainda completamente elucidados [117]. Sabe-se que as HSPs da família 70 apresentam-se em quantidades pequenas nas células em condição de não estresse, porém em condição de estresse elas podem ser sintetizadas rapidamente. Alguns estudos mostraram que ratos submetidos a um exercício agudo exaustivo em esteira rolante apresentam um aumento na síntese de proteínas de estresse, como a HSPs70, nos músculos e em outros tecidos [118-120]. Outros trabalhos também reportaram que o conteúdo de HSPs72 está aumentado em ratos sedentários após uma sessão de exercício exaustivo, em paralelo com uma diminuição na atividade das enzimas GR e CAT [121]. Khassaf e colaboradores observaram um aumento do conteúdo de HSPs60/70 e da atividade da SOD em músculo esquelético de humanos mesmo após exercício não exaustivo [116]. A HSPs70 também aumenta após um treinamento, porém este aumento parece depender da intensidade [117, 122].

Desta forma, as conclusões gerais referentes às adaptações antioxidantes frente ao exercício em diabéticos se resumem em: 1- entre as enzimas antioxidantes no músculo esquelético, a atividade da SOD aumenta com o treinamento e sua regulação é dependente da intensidade [104, 123]; a Mn-SOD é a principal responsável pelo aumento observado na atividade da SOD, enquanto atividade da CuZn-SOD é pouco afetada [104, 124]; a atividade da GSH-PX também é aumentada após o treinamento de *endurance* [124-126]; entretanto, o efeito do treinamento sobre a atividade da CAT ainda é incoerente e controverso [50, 127, 128]; 2- há evidências consideráveis de que as adaptações das enzimas antioxidantes resultantes do treinamento sejam devido à alteração da expressão gênica, tanto com regulações em nível enzimático quando do RNAm [129, 130]; 3- a adaptação das enzimas antioxidantes é fortemente influenciada por uma série de fatores fisiológicos e ambientais, tais como sexo, idade, dieta e medicação. Ratos do sexo feminino têm demonstrado um menor grau de lesão oxidativa muscular induzida pelo exercício e adaptação de enzimas antioxidantes ao treinamento do que ratos do sexo masculino, possivelmente devido o efeito antioxidante do estrogênio [52]. Além disso, animais e seres humanos idosos, geralmente apresentam um grau menor de adaptação das



enzimas antioxidantes que os indivíduos jovens submetidos a uma mesma carga de trabalho [131]. A razão para esta diferença relacionada à idade é complexa e pode estar relacionada a alterações intrínsecas no sistema de defesa antioxidante, assim como na capacidade de transdução de sinais [132]; 4- a elevada atividade das enzimas antioxidantes com o treinamento demonstrou claros benefícios na prevenção do estresse oxidativo em uma variedade de modelos experimentais e condições patogênicas, como: inibição crônica da NOS em coração de ratos [133], eritrócitos e fígado de ratos hiperinsulinêmicos induzidos por dietas ricas em frutose [134], pâncreas de ratos diabéticos induzidos por STZ [135], e toxicidade cardíaca induzida por doxorrubicina em ratos [136].

#### **1.4- Exercício no controle metabólico e biomarcadores de estresse oxidativo**

Existem vários mecanismos propostos que suportam os benefícios do exercício em diabetes. O exercício melhora a função cardiovascular, diminuindo os fatores de risco tais como lipídios plasmáticos, glicemia e índice de massa corporal [137, 138] e diminui o estresse oxidativo, reduzindo o peso corporal, melhorando os parâmetros metabólicos e, principalmente, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes. Desta forma, acredita-se que os benefícios do exercício na função vascular de diabéticos sejam secundários à redução de fatores de risco metabólicos [137] ou do estresse oxidativo [139] e, por isso tem sido amplamente recomendado como uma abordagem terapêutica adicional no tratamento de pacientes diabéticos tipos II [140].

Embora o exercício moderado regular seja recomendado para prevenir a doença cardiovascular em pacientes diabéticos [141] é difícil encorajar os pacientes a se exercitar regularmente. Segundo Leelayuwat e colaboradores, a forma mais bem-sucedida para incorporar o exercício em atividades diárias é começar com exercícios simples, acessíveis e de baixa intensidade [142].

O exercício físico também pode melhorar a função vascular independentemente das melhorias no peso corporal ou hiperglicemia [143] e outros fatores de risco da doença [144]. No estudo de Kusterer e colaboradores, ratos *db/db* que se exercitaram em baixa intensidade, apresentaram melhora na função vascular sem redução do colesterol, do LDL-colesterol, da glicose e nos níveis de insulina [145]. No entanto, o exercício de baixa intensidade pode reduzir

níveis de triglicérides e, ao mesmo tempo, aumentar os níveis de HDL-colesterol [145]. O aumento na concentração plasmática de HDL, após o treinamento aeróbio [146, 147] foi correlacionado com a intensidade e a frequência dos exercícios físicos [146], e na maioria dos casos, este aumento foi associado a melhora da sensibilidade à insulina, triglicérides, perfil lipídico prévio, redução no peso corporal, sexo e idade [148]. Sendo assim, alguns estudos apóiam o potencial do exercício de baixa intensidade, por si só, na melhora do estresse oxidativo [149, 150]. A diminuição do malondialdeído (MDA), importante biomarcador utilizado na avaliação do estresse oxidativo, e o aumento na concentração de antioxidante não enzimático, como a glutathiona reduzida, após o treinamento foram relatados [142] e isso reflete a atenuação de complicações vasculares em pacientes diabéticos que praticam exercício físico regularmente [151].

Evidências sugerem que a medida da HbA1c, glicemia pós-prandial, lipemia e estresse oxidativo também podem fornecer importantes informações clínicas sobre a susceptibilidade de um indivíduo para o aparecimento e a progressão do diabetes. A redução da HbA1c induzida pelo exercício, refletindo o maior controle glicêmico, está associada a menor auto-oxidação induzida pela glicose e a glicação não enzimática de proteínas, reduzindo o estresse oxidativo [152, 153]. Além disso, estudo prospectivo sobre o diabetes no Reino Unido sugere que a redução de 1% na concentração de HbA1c diminui a incidência de complicações microvasculares em 35%, de mortes em 25% e de óbitos em geral de 7% [154].

Apesar da evidente melhora mediada pelo exercício na qualidade de vida dos pacientes diabéticos, resultados divergentes são encontrados na literatura quanto ao efeito do exercício físico sobre o estresse oxidativo no diabetes. Acredita-se que o elevado consumo de oxigênio esteja diretamente relacionado à produção de EROs e contribui para a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que estimula a internalização de colesterol nos macrófagos [155, 156]. Por outro lado, a melhora das defesas antioxidantes da parede arterial foi atribuída ao aumento da expressão da CAT e da eNOS após o treinamento aeróbio [155, 157, 158]. Nesta mesma linha, Ramachandran e colaboradores relataram uma redução em lesões ateroscleróticas pré-existentes em camundongos nocauteados no receptor de LDL e submetidos a sessões diárias de corrida [159].

Moien-Afshari e colaboradores demonstraram que o exercício de intensidade moderada reduz o peso corporal, aumenta a Mn-SOD e a produção de proteínas totais e a fosforilação da eNOS (Ser1177), além de reduzir os níveis de 8-isoprostano (marcador de peroxidação lipídica) e de estresse oxidativo tecidual (níveis de proteína carbonilada na aorta)[143]. Entretanto, exercício de baixa intensidade não alterou o peso corporal, porém provocou uma maior expressão de CuZn-SOD citosólica, e não de Mn-SOD, e ainda ocasionou todos os benefícios acima na aorta de ratos *db/db*. Além disso, ambos os protocolos de exercício físico melhoraram a vasodilatação endotélio-dependente e biodisponibilidade de NO, sem alterar o status hiperglicemiante. Estes resultados sugerem que a regulação da eNOS e das isoformas da SOD desempenham papéis importantes na biodisponibilidade de NO revertendo a disfunção endotelial em diabéticos tipo II. Como também, acredita-se que o aumento do estresse de cisalhamentos induzido pelo exercício seja um importante estímulo para a liberação de NO *in vivo* [160].

O treinamento de resistência aeróbia em ratos diabéticos induzidos por STZ demonstrou uma diminuição na peroxidação lipídica avaliada pelos níveis de TBARS no músculo vasto lateral e aumento da GSH-Px no gastrocnêmio [161]. No entanto, observou-se aumento dos dienos conjugados (marcadores utilizados para avaliar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade) e uma diminuição da atividade da GSH-Px no coração. Por outro lado, o exercício agudo de alta intensidade aumenta os níveis de TBARS no fígado e de dienos conjugados no coração [162]. Esses resultados sugerem que apesar dos efeitos adversos no coração, o treinamento de resistência provoca uma maior expressão da defesa antioxidante dependente de glutatona no músculo esquelético de diabéticos.

Dillard e colaboradores foram os primeiros a mostrar que o pentano, formado a partir da peroxidação lipídica, estava aumentado no ar expirado de indivíduos que haviam se exercitado a 50% do VO<sub>2</sub> máximo [163]. Kanter e colaboradores estudaram corredores de ultramaratona em repouso e encontraram uma correlação positiva entre os níveis de TBARS e as enzimas séricas creatina quinase [164]. Lovlin e colaboradores estudaram indivíduos submetidos a exercícios com intensidades variadas (40, 70 ou 100% VO<sub>2</sub> máximo) e encontraram uma relação significativa entre o lactato sangüíneo e os níveis de TBARS, registrando que os exercícios exaustivos resultavam em um significativo aumento dos níveis de substâncias reativas do oxigênio sobre os níveis de

repouso [165]. Eles também reportaram que o nível TBARS a 40% do  $VO_2$  máximo era menor que antes do exercício, interpretando que o exercício submáximo poderia diminuir a peroxidação lipídica [165]. Neste caso, algumas explicações alternativas devem ser consideradas, como por exemplo: alguns tecidos podem consumir MDA e, talvez com o exercício leve, o consumo tecidual deste marcador seria maior do que sua produção, e apenas com cargas muito pesadas de trabalho e taxa de produção poderia exceder a taxa da sua remoção [50, 103].

Quanto às variações pós-prandial da glicemia, os exercícios agudo e crônico podem auxiliar na proteção contra o estresse oxidativo de três maneiras distintas: 1- o exercício estimula um aumento da atividade de enzimas antioxidantes endógenas; 2- o exercício melhora a depuração de glicose no sangue via translocação do GLUT-4, bem como reforça a ligação da insulina ao seu receptor e é capaz de aumentar a expressão das proteínas da via de sinalização da insulina; 3- o exercício melhora a depuração de triglicérides no sangue reduzindo a meia-vida dos triglicérides dos quilomícrons e aumenta a atividade da lipase lipoprotéica [166]. Segundo a *American College of Sports Medicine*, o exercício pode ser visto como “remédio” para indivíduos com maior risco para o estresse oxidativo pós-prandial [167].

Assim, diante da necessidade de estabelecer quais tipos de treinamento surtem maiores benefícios quanto ao controle metabólico e minimizam o estresse oxidativo envolvido na patogênese do diabetes, realizamos o trabalho que segue no item Artigo Científico.

## 2.0- REFERÊNCIAS

1. Oranje, W.A., Rondas-Colbers, G.J., Swennen, G.N., Jansen, H., and Wolffenbuttel, B.H., Lack of effect on LDL oxidation and antioxidant status after improvement of metabolic control in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 1999; 22: p. 2083-4.
2. Jennings, P.E., The potential of gliclazide, a sulphonylurea to influence the oxidative processes within the pathogenesis of diabetic vascular disease. **Adv Exp Med Biol**, 1994; 366: p. 313-24.
3. Uzel, N., Sivas, A., Uysal, M., and Oz, H., Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. **Horm Metab Res**, 1987; 19: p. 89-90.
4. Baynes, J.W. and Thorpe, S.R., Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, 1999; 48: p. 1-9.
5. Lee, A.Y. and Chung, S.S., Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB J**, 1999; 13: p. 23-30.
6. Wautier, J.L., Wautier, M.P., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Hori, O., Zoukourian, C., Capron, L., Chappey, O., Yan, S.D., Brett, J., and et al., Advanced glycation end products (PFGA) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated PFGA and diabetic complications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1994; 91: p. 7742-6.
7. Ishii, H., Koya, D., and King, G.L., Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. **J Mol Med**, 1998; 76: p. 21-31.
8. Sharma, K. and Ziyadeh, F.N., Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. **Semin Nephrol**, 1997; 17: p. 80-92.
9. Wilson, D.K., Bohren, K.M., Gabbay, K.H., and Quioco, F.A., An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. **Science**, 1992; 257: p. 81-4.
10. Brownlee, M., The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, 2005; 54: p. 1615-25.
11. Nishinaka, T. and Yabe-Nishimura, C., EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 2001; 31: p. 205-16.
12. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., *Free radicals in Biology and Medicine*. 1989, Oxford: Clarendon Press.
13. Engerman, R.L., Kern, T.S., and Larson, M.E., Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. **Diabetologia**, 1994; 37: p. 141-4.
14. Ahmed, N., Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, 2005; 67: p. 3-21.

15. Henle, T., PFGA in foods: do they play a role in uremia? *Kidney Int Suppl*, 2003; S145-7.
16. Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W., Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1998; 44: p. 1139-45.
17. Tanaka, S., Avigad, G., Brodsky, B., and Eikenberry, E.F., Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol*, 1988; 203: p. 495-505.
18. Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D., and Stern, D., Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*, 1994; 269: p. 9889-97.
19. Hammes, H.P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K., and Brownlee, M., Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991; 88: p. 11555-8.
20. Baynes, J.W., Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 1991; 40: p. 405-12.
21. Schmidt, A.M., Hori, O., Cao, R., Yan, S.D., Brett, J., Wautier, J.L., Ogawa, S., Kuwabara, K., Matsumoto, M., and Stern, D., RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes*, 1996; 45 Suppl 3: p. S77-80.
22. Koya, D., Jirousek, M.R., Lin, Y.W., Ishii, H., Kuboki, K., and King, G.L., Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest*, 1997; 100: p. 115-26.
23. Kelly, D.J., Edgley, A.J., Zhang, Y., Thai, K., Tan, S.M., Cox, A.J., Advani, A., Connelly, K.A., Whiteside, C.I., and Gilbert, R.E., Protein kinase C-beta inhibition attenuates the progression of nephropathy in non-diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2009; 24: p. 1782-90.
24. Koya, D. and King, G.L., Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 1998; 47: p. 859-66.
25. Bachschmid, M., van der Loo, B., Schuler, K., Labugger, R., Thurau, S., Eto, M., Kilo, J., Holz, R., Luscher, T.F., and Ullrich, V., Oxidative stress-associated vascular aging is independent of the protein kinase C/NAD(P)H oxidase pathway. *Arch Gerontol Geriatr*, 2004; 38: p. 181-90.
26. Kitada, M., Koya, D., Sugimoto, T., Isono, M., Araki, S., Kashiwagi, A., and Haneda, M., Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2003; 52: p. 2603-14.
27. Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G., Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 1996; 19: p. 257-67.
28. Kuboki, K., Jiang, Z.Y., Takahara, N., Ha, S.W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E.P., Herbert, T.P., Rhodes, C.J., and King, G.L., Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation*, 2000; 101: p. 676-81.

29. Hadi, H.A. and Suwaidi, J.A., Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Vasc Health Risk Manag**, 2007; 3: p. 853-76.
30. Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R., and Schleicher, E.D., High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. **J Clin Invest**, 1998; 101: p. 160-9.
31. Wells, L. and Hart, G.W., O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. **FEBS Lett**, 2003; 546: p. 154-8.
32. Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., and Brownlee, M., Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000; 97: p. 12222-6.
33. Clark, R.J., McDonough, P.M., Swanson, E., Trost, S.U., Suzuki, M., Fukuda, M., and Dillmann, W.H., Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. **J Biol Chem**, 2003; 278: p. 44230-7.
34. Federici, M., Menghini, R., Mauriello, A., Hribal, M.L., Ferrelli, F., Lauro, D., Sbraccia, P., Spagnoli, L.G., Sesti, G., and Lauro, R., Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. **Circulation**, 2002; 106: p. 466-72.
35. Jacobs, J.M., Adkins, J.N., Qian, W.J., Liu, T., Shen, Y., Camp, D.G., 2nd, and Smith, R.D., Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. **J Proteome Res**, 2005; 4: p. 1073-85.
36. Aydin, A., Orhan, H., Sayal, A., Ozata, M., Sahin, G., and Isimer, A., Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. **Clin Biochem**, 2001; 34: p. 65-70.
37. Kesavulu, M.M., Giri, R., Kameswara Rao, B., and Apparao, C., Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. **Diabetes Metab**, 2000; 26: p. 387-92.
38. Meydani, M. and Azzi, A., Diabetes risk: antioxidants or lifestyle? **Am J Clin Nutr**, 2009; 90: p. 253-4.
39. Santini, S.A., Marra, G., Giardina, B., Cotroneo, P., Mordente, A., Martorana, G.E., Manto, A., and Ghirlanda, G., Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. **Diabetes**, 1997; 46: p. 1853-8.
40. Marra, G., Cotroneo, P., Pitocco, D., Manto, A., Di Leo, M.A., Ruotolo, V., Caputo, S., Giardina, B., Ghirlanda, G., and Santini, S.A., Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes: a case for gender difference. **Diabetes Care**, 2002; 25: p. 370-5.
41. Murakami, K., Kondo, T., Ohtsuka, Y., Fujiwara, Y., Shimada, M., and Kawakami, Y., Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. **Metabolism**, 1989; 38: p. 753-8.
42. Matteucci, E. and Giampietro, O., Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients: further evidence. **Diabetes Care**, 2001; 24: p. 167-8.

43. Choudhary, D., Chandra, D., and Kale, R.K., Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicol Lett*, 1997; 93: p. 141-52.
44. Grant, M.H. and Duthie, S.J., Conjugation reactions in hepatocytes isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol*, 1987; 36: p. 3647-55.
45. Matkovichs, B., Varga, S.I., Szabo, L., and Witas, H., The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm Metab Res*, 1982; 14: p. 77-9.
46. Arai, K., Iizuka, S., Tada, Y., Oikawa, K., and Taniguchi, N., Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta*, 1987; 924: p. 292-6.
47. Jennings, P.E. and Barnett, A.H., New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. *Diabet Med*, 1988; 5: p. 111-7.
48. Astrand, P.O., Quantification of exercise capability and evaluation of physical capacity in man. *Prog Cardiovasc Dis*, 1976; 19: p. 51-67.
49. Sjodin, B., Hellsten Westing, Y., and Apple, F.S., Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med*, 1990; 10: p. 236-54.
50. Jenkins, R.R., Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr*, 1993; 3: p. 356-75.
51. Davies, K.J., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., and Packer, L., Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982; 107: p. 1198-205.
52. Tiidus, P.M., Bombardier, E., Hidiroglou, N., and Madere, R., Gender and exercise influence on tissue antioxidant vitamin status in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1999; 45: p. 701-10.
53. Goldfarb, A.H., Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol*, 1999; 24: p. 249-66.
54. Ji, L.L., Fu, R., and Mitchell, E.W., Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol*, 1992; 73: p. 1854-9.
55. Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., and McKenzie, M.J., Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. *Med Sci Sports Exerc*, 2006; 38: p. 1098-105.
56. Michailidis, Y., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Papassotiropoulos, I., and Kouretas, D., Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, 2007; 39: p. 1107-13.
57. Ilhan, N., Kamanli, A., and Ozmerdivenli, R., Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Arch Med Res*, 2004; 35: p. 294-300.
58. Boveris, A. and Chance, B., The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, 1973; 134: p. 707-16.



59. Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B., The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 1972; 128: p. 617-30.
60. Herrero, A. and Barja, G., ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *J Bioenerg Biomembr*, 1997; 29: p. 241-9.
61. Richardson, R.S., Leigh, J.S., Wagner, P.D., and Noyszewski, E.A., Cellular PO<sub>2</sub> as a determinant of maximal mitochondrial O<sub>2</sub> consumption in trained human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 1999; 87: p. 325-31.
62. Richardson, R.S., Newcomer, S.C., and Noyszewski, E.A., Skeletal muscle intracellular PO<sub>2</sub> assessed by myoglobin desaturation: response to graded exercise. *J Appl Physiol*, 2001; 91: p. 2679-85.
63. Bailey, D.M., What regulates exercise-induced reactive oxidant generation: mitochondrial O<sub>2</sub> flux or PO<sub>2</sub>? *Med Sci Sports Exerc*, 2001; 33: p. 681-2.
64. Bailey, D.M., Davies, B., and Young, I.S., Intermittent hypoxic training: implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. *Clin Sci (Lond)*, 2001; 101: p. 465-75.
65. Alessio, H.M., Hagerman, A.E., Fulkerson, B.K., Ambrose, J., Rice, R.E., and Wiley, R.L., Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 2000; 32: p. 1576-81.
66. MacDonald, M.J. and Brown, L.J., Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied. *Arch Biochem Biophys*, 1996; 326: p. 79-84.
67. Rasmussen, U.F., Krstrup, P., Bangsbo, J., and Rasmussen, H.N., The effect of high-intensity exhaustive exercise studied in isolated mitochondria from human skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 2001; 443: p. 180-7.
68. Jesina, P., Kholova, D., Bolehovska, R., Cervinkova, Z., Drahota, Z., and Houstek, J., Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by rat liver mitochondria. *Physiol Res*, 2004; 53: p. 305-10.
69. Chevion, S., Moran, D.S., Heled, Y., Shani, Y., Regev, G., Abbou, B., Berenshtein, E., Stadtman, E.R., and Epstein, Y., Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100: p. 5119-23.
70. Appell, H.J., Soares, J.M., and Duarte, J.A., Exercise, muscle damage and fatigue. *Sports Med*, 1992; 13: p. 108-15.
71. Karanth, J. and Jeevaratnam, K., Oxidative stress and antioxidant status in rat blood, liver and muscle: effect of dietary lipid, carnitine and exercise. *Int J Vitam Nutr Res*, 2005; 75: p. 333-9.
72. Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002; 82: p. 47-95.
73. Nosaka, K. and Newton, M., Concentric or eccentric training effect on eccentric exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sports Exerc*, 2002; 34: p. 63-9.
74. Packer, L., Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci*, 1997; 15: p. 353-63.

75. Vina, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C., Asensi, M., Pallardo, F.V., Cuesta, A., Ferrero, J.A., Terada, L.S., and Repine, J.E., Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. ***IUBMB Life***, 2000; 49: p. 539-44.
76. Hellsten, Y., Hansson, H.A., Johnson, L., Frandsen, U., and Sjodin, B., Increased expression of xanthine oxidase and insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in skeletal muscle after strenuous exercise in humans. ***Acta Physiol Scand***, 1996; 157: p. 191-7.
77. McCord, J.M., Roy, R.S., and Schaffer, S.W., Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. ***Adv Myocardiol***, 1985; 5: p. 183-9.
78. Vina, J., Sastre, J., Asensi, M., and Packer, L., Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise. ***Methods Enzymol***, 1995; 251: p. 237-43.
79. Xia, Y. and Zweier, J.L., Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. ***J Biol Chem***, 1995; 270: p. 18797-803.
80. Heunks, L.M., Vina, J., van Herwaarden, C.L., Folgering, H.T., Gimeno, A., and Dekhuijzen, P.N., Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. ***Am J Physiol***, 1999; 277: p. R1697-704.
81. Vollaard, N.B., Shearman, J.P., and Cooper, C.E., Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. ***Sports Med***, 2005; 35: p. 1045-62.
82. Pyne, D.B., Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. ***Aust J Sci Med Sport***, 1994; 26: p. 49-58.
83. Chen, T.C. and Hsieh, S.S., Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. ***Med Sci Sports Exerc***, 2001; 33: p. 1732-8.
84. Yamada, M., Suzuki, K., Kudo, S., Totsuka, M., Simoyama, T., Nakaji, S., and Sugawara, K., Effect of exhaustive exercise on human neutrophils in athletes. ***Luminescence***, 2000; 15: p. 15-20.
85. Quindry, J.C., Stone, W.L., King, J., and Broeder, C.E., The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. ***Med Sci Sports Exerc***, 2003; 35: p. 1139-45.
86. Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B., and Leeuwenburgh, C., Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. ***Free Radic Biol Med***, 2001; 31: p. 745-53.
87. Mastaloudis, A., Morrow, J.D., Hopkins, D.W., Devaraj, S., and Traber, M.G., Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. ***Free Radic Biol Med***, 2004; 36: p. 1329-41.
88. Cooper, C.E., Vollaard, N.B., Choueiri, T., and Wilson, M.T., Exercise, free radicals and oxidative stress. ***Biochem Soc Trans***, 2002; 30: p. 280-5.

89. Comporti, M., Signorini, C., Buonocore, G., and Ciccoli, L., Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med*, 2002; 32: p. 568-76.
90. Emerit, J., Beaumont, C., and Trivin, F., Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*, 2001; 55: p. 333-9.
91. Ji, L.L., Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*, 1995; 18: p. 1079-86.
92. Alessio, H.M. and Goldfarb, A.H., Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol*, 1988; 64: p. 1333-6.
93. Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., Nyakas, C., and Goto, S., The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*, 1999; 27: p. 69-74.
94. Powers, S.K., Ji, L.L., and Leeuwenburgh, C., Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*, 1999; 31: p. 987-97.
95. Clarkson, P.M. and Hubal, M.J., Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil*, 2002; 81: p. S52-69.
96. Duarte, J.A., Carvalho, F., Fernandes, E., Remiao, F., Bastos, M.L., Magalhaes, J., and Appell, H.J., D-amphetamine-induced hydrogen peroxide production in skeletal muscle is modulated by monoamine oxidase inhibition. *Int J Sports Med*, 2004; 25: p. 446-9.
97. Harris, E.D., Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J*, 1992; 6: p. 2675-83.
98. Oberley, L.W., St Clair, D.K., Autor, A.P., and Oberley, T.D., Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch Biochem Biophys*, 1987; 254: p. 69-80.
99. O'Neill, C.A., Stebbins, C.L., Bonigut, S., Halliwell, B., and Longhurst, J.C., Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol*, 1996; 81: p. 1197-206.
100. Ji, L.L., Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 2008; 44: p. 142-52.
101. Jenkins, R.R., Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*, 1988; 5: p. 156-70.
102. Kanter, M.M., Hamlin, R.L., Unverferth, D.V., Davis, H.W., and Merola, A.J., Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. *J Appl Physiol*, 1985; 59: p. 1298-303.
103. Quintanilha, A.T., Effects of physical exercise and/or vitamin E on tissue oxidative metabolism. *Biochem Soc Trans*, 1984; 12: p. 403-4.
104. Higuchi, M., Cartier, L.J., Chen, M., and Holloszy, J.O., Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol*, 1985; 40: p. 281-6.
105. Leeuwenburgh, C. and Heinecke, J.W., Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem*, 2001; 8: p. 829-38.

106. Brady, P.S., Brady, L.J., and Ullrey, D.E., Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. **J Nutr**, 1979; 109: p. 1103-9.
107. Burk, R.F., Biological activity of selenium. **Annu Rev Nutr**, 1983; 3: p. 53-70.
108. Cesquini, M., Torsoni, M.A., and Ogo, S.H., Adaptive Response to Swimming Exercise: Antioxidant Systems and Lipid Peroxidation. **Journal of Anti-Aging Medicine**, 1999; 2: p. 357-363.
109. Tiidus, P.M., Pushkarenko, J., and Houston, M.E., Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. **Am J Physiol**, 1996; 271: p. R832-6.
110. Pincemail, J., Deby, C., Camus, G., Pirnay, F., Bouchez, R., Massaux, L., and Goutier, R., Tocopherol mobilization during intensive exercise. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, 1988; 57: p. 189-91.
111. Camus, G., Pincemail, J., Roesgen, A., Dreezen, E., Sluse, F.E., and Deby, C., Tocopherol mobilization during dynamic exercise after beta-adrenergic blockade. **Arch Int Physiol Biochim**, 1990; 98: p. 121-6.
112. Duthie, G.G., Robertson, J.D., Maughan, R.J., and Morrice, P.C., Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. **Arch Biochem Biophys**, 1990; 282: p. 78-83.
113. Robertson, J.D., Maughan, R.J., Duthie, G.G., and Morrice, P.C., Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. **Clin Sci (Lond)**, 1991; 80: p. 611-8.
114. Guillard, J.C., Penaranda, T., Gallet, C., Boggio, V., Fuchs, F., and Klepping, J., Vitamin status of young athletes including the effects of supplementation. **Med Sci Sports Exerc**, 1989; 21: p. 441-9.
115. Essig, D.A. and Nosek, T.M., Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? **Can J Appl Physiol**, 1997; 22: p. 409-28.
116. Khassaf, M., Child, R.B., McArdle, A., Brodie, D.A., Esanu, C., and Jackson, M.J., Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. **J Appl Physiol**, 2001; 90: p. 1031-5.
117. Liu, Y. and Steinacker, J.M., Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. **Front Biosci**, 2001; 6: p. D12-25.
118. Locke, M., Noble, E.G., and Atkinson, B.G., Exercising mammals synthesize stress proteins. **Am J Physiol**, 1990; 258: p. C723-9.
119. Salo, D.C., Donovan, C.M., and Davies, K.J., HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. **Free Radic Biol Med**, 1991; 11: p. 239-46.
120. Samelman, T.R., Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. **Exp Physiol**, 2000; 85: p. 92-102.
121. Smolka, M.B., Zoppi, C.C., Alves, A.A., Silveira, L.R., Marangoni, S., Pereira-Da-Silva, L., Novello, J.C., and Macedo, D.V., HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 2000; 279: p. R1539-45.

122. Liu, J., Yeo, H.C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S.J., Chyu, D.W., Brooks, G.A., and Ames, B.N., Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol**, 2000; 89: p. 21-8.
123. Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., and Dudley, G., Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol**, 1994; 266: p. R375-80.
124. Ji, L.L., Stratman, F.W., and Lardy, H.A., Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. **Arch Biochem Biophys**, 1988; 263: p. 150-60.
125. Leeuwenburgh, C., Fiebig, R., Chandwaney, R., and Ji, L.L., Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **Am J Physiol**, 1994; 267: p. R439-45.
126. Lawler, J.M., Powers, S.K., Visser, T., Van Dijk, H., Kordus, M.J., and Ji, L.L., Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. **Am J Physiol**, 1993; 265: p. R1344-50.
127. Paduraru, I., Ciocoiu, M., Petrescu, E., Saramet, A., Colev, V., and Paduraru, O., [The effect of the combination of vitamin E and C on the oxidative stress parameters in physical exercise]. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, 1997; 101: p. 103-8.
128. Fielding, R.A. and Meydani, M., Exercise, free radical generation, and aging. **Ageing (Milano)**, 1997; 9: p. 12-8.
129. Oh-ishi, S., Kizaki, T., Nagasawa, J., Izawa, T., Komabayashi, T., Nagata, N., Suzuki, K., Taniguchi, N., and Ohno, H., Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 1997; 24: p. 326-32.
130. Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Bejma, J., Ookawara, T., Ohno, H., and Ji, L.L., Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. **Am J Physiol**, 1999; 277: p. R856-62.
131. Ji, L.L., Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? **Ann N Y Acad Sci**, 2001; 928: p. 236-47.
132. McArdle, A., Vasilaki, A., and Jackson, M., Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. **Ageing Res Rev**, 2002; 1: p. 79-93.
133. Husain, K. and Hazelrigg, S.R., Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. **Biochim Biophys Acta**, 2002; 1587: p. 75-82.
134. Thirunavukkarasu, V., Balakrishnan, S.D., Ravichandran, M.K., and Anuradha, C.V., Influence of 6-week exercise training on erythrocyte and liver antioxidant defense in hyperinsulinemic rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 2003; 135: p. 31-7.
135. Coskun, O., Ocakci, A., Bayraktaroglu, T., and Kanter, M., Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Tohoku J Exp Med**, 2004; 203: p. 145-54.

136. Chicco, A.J., Hydock, D.S., Schneider, C.M., and Hayward, R., Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. *J Appl Physiol*, 2006; 100: p. 519-27.
137. Kingwell, B.A., Tran, B., Cameron, J.D., Jennings, G.L., and Dart, A.M., Enhanced vasodilation to acetylcholine in athletes is associated with lower plasma cholesterol. *Am J Physiol*, 1996; 270: p. H2008-13.
138. Wing, R.R., Goldstein, M.G., Acton, K.J., Birch, L.L., Jakicic, J.M., Sallis, J.F., Jr., Smith-West, D., Jeffery, R.W., and Surwit, R.S., Behavioral science research in diabetes: lifestyle changes related to obesity, eating behavior, and physical activity. *Diabetes Care*, 2001; 24: p. 117-23.
139. Chang, S.P., Chen, Y.H., Chang, W.C., Liu, I.M., and Cheng, J.T., Increase of anti-oxidation by exercise in the liver of obese Zucker rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004; 31: p. 506-11.
140. Nojima, H., Watanabe, H., Yamane, K., Kitahara, Y., Sekikawa, K., Yamamoto, H., Yokoyama, A., Inamizu, T., Asahara, T., and Kohno, N., Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2008; 57: p. 170-6.
141. Buse, J.B., Ginsberg, H.N., Bakris, G.L., Clark, N.G., Costa, F., Eckel, R., Fonseca, V., Gerstein, H.C., Grundy, S., Nesto, R.W., Pignone, M.P., Plutzky, J., Porte, D., Redberg, R., Stitzel, K.F., and Stone, N.J., Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Circulation*, 2007; 115: p. 114-26.
142. Leelayuwat, N., Tunkumnerdthai, O., Donsom, M., Punyaek, N., Manimanakorn, A., Kukongviriyapan, U., and Kukongviriyapan, V., An alternative exercise and its beneficial effects on glycaemic control and oxidative stress in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008; 82: p. e5-8.
143. Moien-Afshari, F., Ghosh, S., Elmi, S., Rahman, M.M., Sallam, N., Khazaei, M., Kieffer, T.J., Brownsey, R.W., and Laher, I., Exercise restores endothelial function independently of weight loss or hyperglycaemic status in db/db mice. *Diabetologia*, 2008; 51: p. 1327-37.
144. Green, D.J., Walsh, J.H., Maiorana, A., Best, M.J., Taylor, R.R., and O'Driscoll, J.G., Exercise-induced improvement in endothelial dysfunction is not mediated by changes in CV risk factors: pooled analysis of diverse patient populations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 285: p. H2679-87.
145. Kusterer, K., Pohl, T., Fortmeyer, H.P., Marz, W., Scharnagl, H., Oldenburg, A., Angermuller, S., Fleming, I., Usadel, K.H., and Busse, R., Chronic selective hypertriglyceridemia impairs endothelium-dependent vasodilatation in rats. *Cardiovasc Res*, 1999; 42: p. 783-93.
146. Kraus, W.E., Houmard, J.A., Duscha, B.D., Knetzger, K.J., Wharton, M.B., McCartney, J.S., Bales, C.W., Henes, S., Samsa, G.P., Otvos, J.D., Kulkarni, K.R., and Slentz, C.A., Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med*, 2002; 347: p. 1483-92.
147. Srividhya, S., Ravichandran, M.K., and Anuradha, C.V., Metformin attenuates blood lipid peroxidation and potentiates antioxidant defense in high fructose-fed rats. *J Biochem Mol Biol Biophys*, 2002; 6: p. 379-85.

148. Thompson, P.D. and Rader, D.J., Does exercise increase HDL cholesterol in those who need it the most? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001; 21: p. 1097-8.
149. Kaczor, J.J., Hall, J.E., Payne, E., and Tarnopolsky, M.A., Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radic Biol Med*, 2007; 43: p. 145-54.
150. Heitkamp, H.C., Wegler, S., Brehme, U., and Heinle, H., Effect of an 8-week endurance training program on markers of antioxidant capacity in women. *J Sports Med Phys Fitness*, 2008; 48: p. 113-9.
151. Yamagishi, S. and Imaizumi, T., Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des*, 2005; 11: p. 2279-99.
152. Ding, Y., Kantarci, A., Hasturk, H., Trackman, P.C., Malabanan, A., and Van Dyke, T.E., Activation of RAGE induces elevated O<sub>2</sub>- generation by mononuclear phagocytes in diabetes. *J Leukoc Biol*, 2007; 81: p. 520-7.
153. Ciuchi, E., Odetti, P., and Prando, R., Relationship between glutathione and sorbitol concentrations in erythrocytes from diabetic patients. *Metabolism*, 1996; 45: p. 611-3.
154. Stratton, I.M., Adler, A.I., Neil, H.A., Matthews, D.R., Manley, S.E., Cull, C.A., Hadden, D., Turner, R.C., and Holman, R.R., Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*, 2000; 321: p. 405-12.
155. Shern-Brewer, R., Santanam, N., Wetzstein, C., White-Welkley, J., and Parthasarathy, S., Exercise and cardiovascular disease: a new perspective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998; 18: p. 1181-7.
156. Benitez, S., Sanchez-Quesada, J.L., Lucero, L., Arcelus, R., Ribas, V., Jorba, O., Castellvi, A., Alonso, E., Blanco-Vaca, F., and Ordonez-Llanos, J., Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis*, 2002; 160: p. 223-32.
157. Sanchez-Quesada, J.L., Ortega, H., Payes-Romero, A., Serrat-Serrat, J., Gonzalez-Sastre, F., Lasuncion, M.A., and Ordonez-Llanos, J., LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. *Atherosclerosis*, 1997; 132: p. 207-13.
158. Meilhac, O., Ramachandran, S., Chiang, K., Santanam, N., and Parthasarathy, S., Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001; 21: p. 1681-8.
159. Ramachandran, S., Penumetcha, M., Merchant, N.K., Santanam, N., Rong, R., and Parthasarathy, S., Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. *Atherosclerosis*, 2005; 178: p. 33-8.
160. Gielen, S., Schuler, G., and Hambrecht, R., Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation*, 2001; 103: p. E1-6.
161. Gul, M., Laaksonen, D.E., Atalay, M., Vider, L., and Hanninen, O., Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation

- in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports*, 2002; 12: p. 163-70.
162. Khanna, S., Atalay, M., Laaksonen, D.E., Gul, M., Roy, S., and Sen, C.K., Alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J Appl Physiol*, 1999; 86: p. 1191-6.
  163. Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., Dumelin, E.E., and Tappel, A.L., Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol*, 1978; 45: p. 927-32.
  164. Kanter, M.M., Nolte, L.A., and Holloszy, J.O., Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol*, 1993; 74: p. 965-9.
  165. Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., and Belcastro, A.N., Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1987; 56: p. 313-6.
  166. Tucker, P.S., Fisher-Wellman, K., and Bloomer, R.J., Can exercise minimize postprandial oxidative stress in patients with type 2 diabetes? *Curr Diabetes Rev*, 2008; 4: p. 309-19.
  167. American College of Sports Medicine, Durstine, J.L., Moore, G., Painter, P., and S, R., *Exercise Management for Persons with Chronic Diseases and Disabilities*, ed. 3. Champaign: Human Kinetics, 2009.



### 3.0- ARTIGO CIENTÍFICO

#### **The effects of different training programs on antioxidant status, oxidative stress and metabolic control in type 2 diabetes mellitus**

V.N. Oliveira<sup>1</sup>, M.L.M.P. Fernandes<sup>2</sup>, A. Bessa<sup>1</sup>, R.J.S. Oliveira<sup>1</sup>, M.T. Mello<sup>3</sup>, G.G. Agostini<sup>1</sup>, P.T. Jorge<sup>2</sup>, F.S. Espindola<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labes) do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia- UFU, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia- UFU, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Centro de Estudos em Psicobiologia e Exercício (CEPE) Departamento de Psicobiologia Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP.

To whom correspondence should be sent: Foued Salmen Espindola; Address: Universidade Federal de Uberlândia Campus Umuarama Bloco 2E sala 39A, Uberlândia - MG-Brasil CEP: 38400-902; Email: fouedespindola@gmail.com; Telephone number: (55 34) 3218-2477, Fax: (55 34) 3218-2203.

Key words: Diabetes; Exercise; Metabolic Control; Antioxidants.

## Abstract

We analyzed the effects of 12 weeks of three exercise programs on type 2 diabetic (T2DM) male and female human subjects ( $30.23 \pm 3.89 \text{ kg/m}^2$ ;  $53.93 \pm 9.87$  years old) randomly divided into four groups: aerobic training (AT; N=11), strength training (ST; N=10), combined training (CBT; N=10) and no training (NT; N=12). Metabolic control, anthropometric parameters, lipid and hematological profile, kidney and liver function markers, hormones (TSH and cortisol), antioxidant enzymes and oxidative stress markers were assessed prior to and after the training programs. At baseline, fasting blood glucose (FPG) and hemoglobin A1C (HbA1c) in ST were higher than in NT (FPG =  $194.22 \pm 79.40 \text{ mg/dL}$  vs.  $148.81 \pm 43.15 \text{ mg/dL}$ ,  $p < 0.05$ ; HbA1c =  $8.51 \pm 2.46\%$  vs.  $7.04 \pm 0.68\%$ ,  $p < 0.05$ ). After the training, we no longer observed differences among these groups, suggesting an improvement on these parameters for the ST group. After the AT program, catalase and superoxide dismutase activities, nitrite concentration, levels of sulfhydryl groups and oxygen consumption plateau were elevated ( $p < 0.05$ ). No changes were observed in antioxidant enzymes and oxidative stress markers in ST group. The levels of sulfhydryl groups diminished in the NT group ( $P < 0.01$ ) and increased in the CBT group ( $P < 0.05$ ). These data demonstrate that the aerobic training program for the T2DM subjects provided important up regulation in antioxidant enzymes and increased nitric oxide bioavailability, which may help minimize oxidative stress and the development of the chronic complications of diabetes. We propose that the beneficial effects observed in the metabolic parameters of the ST group occurred in response to the poor baseline metabolic health observed in this group and not necessarily by the training itself.

## Introduction

Oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS), which is generated by hyperglycemia, is one of the major focus of recent research related to diabetes mellitus. Growing evidence indicates that oxidative stress is increased in diabetes due to overproduction of ROS and decreased efficiency of antioxidant defenses<sup>[1,2]</sup> and may be linked to the development of chronic complications of diabetes<sup>[3,4]</sup>. Mechanisms that contribute to the formation of free radicals in diabetes mellitus may include not only increased non-enzymatic and auto-oxidative glycosylation but also metabolic stress resulting from changes in energy metabolism, the levels of inflammatory mediators and the status of antioxidant defense systems<sup>[5,6]</sup>.

Physical exercise exerts numerous favorable effects on general health<sup>[7]</sup>. Specifically, exercise has been shown to improve glucose metabolism in the insulin-resistant state<sup>[8]</sup>, prevent the impairment in nitric oxide (NO) availability<sup>[9]</sup> and has been considered as an antioxidant<sup>[10]</sup>. Regarding oxidative stress, both acute aerobic<sup>[11]</sup> and anaerobic<sup>[12]</sup> exercise are known to be producers of ROS. Oxidative stress also up regulates the expression of antioxidants enzymes. What remains to be elucidated is whether or not exercise can compensate, or even supercompensate, its ROS production in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients.

Exercise-induced oxidative stress may function in a similar manner to the general principles of exercise training. In order for an adaptation to occur, the physiological stimulus applied (in this case ROS and reactive nitrogen species (RNS) production) must exceed a certain minimal threshold, effectively overloading the system. If overload is achieved, the physiological capacity of the body will expand or adapt and ultimately lead to improvements in health and/or human performance<sup>[13]</sup>.

Considering that T2DM and overweight people are already at risk for oxidative stress by themselves, the supplementary exposure to exercise may cause an imbalance between oxidants and antioxidants. Therefore, we investigated the influence of three different exercise programs over 12 weeks on oxidative stress markers, antioxidant status and metabolic parameters in T2DM subjects.

## **Methods**

### **Subjects**

The T2DM subjects were selected at the diabetes clinic of the University Clinical Hospital from February 2007 to December 2008. We randomized 48 T2DM subjects according to the criteria described by American Diabetes Association (fig 1)<sup>[14]</sup>. The four groups, aerobic training (AT), strength training (ST), combined training (CBT) and no training (NT), were matched with respect to age, body mass index (BMI), diagnostic time and gender. None of the subjects were involved in organized physical activity programs. The group allocation characteristics and the drug therapies used by the subjects of each group are described in Table 1. One subject did not complete the study due to health problems unrelated to the investigation, and four subjects did not complete the study due to personal reasons. Subjects with type 1 diabetes mellitus, recent infections, renal or hepatic insufficiency, muscular or joint disability, active coronary artery disease, hypertension (>160/100 mmHg), heart failure, IMC > 35 kg/m<sup>2</sup>, using hormonal replacement therapy, or supplementation with antioxidants were not included in the study. All participants gave written, informed consent to the training program. This work was approved by ethics committee of the Federal University of Uberlandia (n<sup>o</sup> 141/06).

### **Pre training care**

Prior to each session, all participants' blood glucose, resting blood pressure and heart rate were recorded. The trainers were instructed to abide by the following recommendations. Subjects that arrived with blood glucose level of <100 mg/dL were given the choice of having a 15 g carbohydrate snack or exercising for 20 to 30 minutes. Blood glucose concentrations were then reassessed to make sure it was not decreased compared to the original level. If the pre-exercise blood glucose level was >300 mg/dL, subjects began exercise and were reassessed in 20 to 30 minutes to make sure the blood glucose level had not increased. If the blood glucose level increased, exercise was stopped. Any time the subjects had symptoms of hypoglycemia, their blood glucose level was assessed. If hypoglycemia was confirmed, subjects were given a predetermined quantity of carbohydrate snack based on their blood glucose level: <70 mg/dL=15 g of carbohydrate, <50 mg/dL=20 g of carbohydrate, and <40 mg/dL=30 g of carbohydrate). After their blood glucose level was monitored and controlled, they

were asked to sit for 15 minutes, and their blood glucose was reassessed. If no increase in blood glucose level was noted, these steps were repeated until the blood glucose level rose above 70 mg/dL<sup>[15]</sup>. A pre-exercise blood pressure of <140/90 mmHg was required for the subjects to begin exercise<sup>[16]</sup>. If the subjects' pre-exercise blood pressure was  $\geq$ 140/90 mm Hg, they were asked to sit quietly for 10 minutes and were reassessed. No exercise was permitted that day if a lower resting blood pressure was not achieved.

### **Blood pressure and body composition**

Systolic and diastolic pressure was measured using a standard aneroid sphygmomanometer. Body weight was measured to the nearest 0.05 kg and height to the nearest 0.1 cm, and these values were used to calculate BMI (kg/m<sup>2</sup>). Body density was calculated from three-site skinfold measurements (men: chest, abdomen, and thigh; women: triceps, thigh, and suprailiac) using equations of Jackson and Pollack and the Siri equation to convert body density to percent body fat.<sup>[17]</sup> Waist-to-hip ratio was determined by measuring waist circumference at the narrowest region between the costal margin and iliac crest and dividing by the hip circumference measured at the greatest gluteal protuberance.

### **Muscle strength and oxygen consumption ( $VO_{2peak}$ )**

The one-maximum repetition (1-RM) was used to determine the muscle strength for all strength exercises (leg press, bench press, lat pull down, seated rowing, shoulder press, abdominal curls and knee curls) before the first training session. Subjects warmed-up performing two sets of 10 repetitions of each exercise using light loads five minutes before the test to avoid injuries. All participants successfully completed the test within three to five attempts. Three minutes of rest were allowed between repetitions. The Valsalva maneuver was not used. To prescribe the aerobic training, the subjects were submitted to an effort test carried out on a cycle ergometer (ERGO-FIT 167, Pirmasens, Germany) with room temperature maintained between 24 and 26°C. Participants engaged in stretching exercises and a brief two minute warm-up on the cycle-ergometer with no load before the test started. Heart rate was measured continually with a cardiac monitor (Polar Electro Oy, Kempele, Finland), and blood samples (25  $\mu$ L) were obtained from the earlobe at the end of each stage for lactate threshold (LT) determination. The test began with a 25 W load, which was increased 25 W every two minutes until exhaustion. The pedal rotation frequency was kept between 68

and 75 rpm. The gas analysis was performed with a commercially available system (FITMATE, COSMED, Italy) to measure the plateau in oxygen consumption ( $VO_{2peak}$ ) during the test. As many of the subjects were unable to sustain the exercise long enough to accurately determine the  $VO_{2peak}$ , the training load of the AT and CBT group were defined by the LT.

### **Exercise training programs**

Training sessions were supervised by a certified instructor. Each program consisted of three one-hour sessions per week over 12 weeks. The ST routine was focused on whole body large muscle groups. It consisted of a circuit of seven exercises: leg press, bench press, lat pull down, seated rowing, shoulder press, abdominal curls and knee curls. During the first two weeks the subjects performed two sets of 10 repetitions with a workload at 50% of 1-RM and a two min rest between the circuit laps. During the remaining weeks (weeks 3 to 12) the subjects performed four sets of 8 to 12 repetitions, and the loading was constantly corrected so that all sets were sustained until exhaustion. The AT consisted of cycling at a heart rate corresponding to the LT. During the first week, they trained for 20 min followed by a 10 min time increment each week until reaching a 50 min aerobic training session. The CBT consisted of ST interchange with AT performed at the same intensity and half the volume of the AT and ST groups (i.e. during the second week of training the subjects cycled for five minutes, performed one lap in strength training circuit, two sets of fifteen reps for each strength exercise and returned for five more minutes of cycling). The training routines of AT, ST and CBT groups are summarized in Table 2. The subjects randomized to the NT group were required to come to the University three times per week exactly like the other groups to perform light stretch exercises designed to marginally elevate their heart rate.

### **Blood and saliva collection and preparation**

Blood and saliva samples were collected following a 12 h fast and 48 h without exercise. The blood was collected via a cannula previously introduced into an antecubital vein and saliva was collected by spitting method<sup>[18]</sup>. All samples were collected in the morning to avoid the confounding effect of diurnal variation of oxidative stress parameters as previously reported<sup>[19]</sup>. Saliva samples were placed in pre-cooled mini-tubes and kept on ice until centrifuged at 12,000 g (4 °C). Blood samples were collected into 10 mL EDTA, sodium heparin, and serum separator

vacuum tubes (Vacutainer). All serum samples were allowed to clot, and then serum and plasma were separated by centrifugation at 4°C for 15 min at 2,000 g. After removal of plasma and buffy coat layers, erythrocytes were washed three times with two volumes of isotonic saline. Then, erythrocytes were lysed with cold distilled water. For salivary nitric oxide determination, lipid peroxidation product, levels of sulfhydryl groups and catalase activity, the samples were stored at –80°C until analysis. All other parameters were determined on the same day of collection. All subject samples were analyzed in duplicate and then averaged.

### **Metabolic control parameters**

The serum biochemistry parameters of fasting plasma glucose, post-prandial plasma glucose, glycated hemoglobin total cholesterol, HDL cholesterol, plasma triglycerides, total protein, albumin, urate, potassium, sodium, creatinine, urea, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma glutamyl transferase, creatine kinase and alkaline phosphatase were determined using commercial kits. Cortisol and thyroid-stimulating hormone were determined by chemiluminescence assay (Diagnostic Products Corporation, LA, USA – minimal value of detection 15 pg/mL). The hemograms were carried out automatically on a Coulter STKS apparatus (Coulter Electronics, USA).

### **Oxidative stress parameters**

*Erythrocyte assays of antioxidant enzymes activities and plasmatic total antioxidant status:* The catalase (CAT) activity was assayed spectrophotometrically by monitoring hydrogen peroxide decomposition at 240 nm<sup>[20]</sup>. The Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and total antioxidant status (TAS) were assessed using a commercial kit (Randox NX2332 Crumlin, UK).

*Determination of plasma lipid peroxidation products, and protein-bound sulfhydryl groups:* The lipid peroxidation in plasma was measured by determining the thiobarbituric acid reacting substance (TBARS) levels with a commercially available kit (Cayman, Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Lipid peroxide concentrations were expressed in terms of malonaldehyde (MDA) concentration (µM). The levels of plasma protein-bound sulfhydryl were determined by using 5, 5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as previously describe by Faure &

Lafond<sup>[21]</sup>. The NO levels were measured in saliva as nitrites using the Griess reaction<sup>[22]</sup>. Standard curves for sodium nitrite were prepared.

### **Statistical analysis**

The mean and standard deviation of various parameters evaluated in the blood and saliva of the four groups were calculated. The Kolmogorov-Smirnov test was carried out to assess the normality of variable distribution. The mean differences among training groups were compared by Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s post hoc test when obtaining non-parametric values. The mean differences among training groups were compared by a two-way ANOVA followed by the Fisher LSD post hoc test when obtaining parametric values. A one-way ANOVA was used to compare the training groups at baseline. Statistical analysis was performed using STATISTICA version 6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).



## Results

The age, diagnostic time, body mass index and gender of T2DM subjects were not different among the groups. At the onset of the study, all groups had similar profiles for all clinical parameters examined except for fasting plasma glucose (FPG) ( $p=0.020$ ) and glycated hemoglobin ( $HbA_{1c}$ ) ( $p=0.038$ ) for ST group compared with NT group. Other parameters also presented alterations, and all of them are detailed in Table 3. At the end of the training program, the differences found for FPG and  $HbA_{1c}$  were no longer observed due to a decrease of FPG and  $HbA_{1c}$  in the ST group. Cortisol levels were lower ( $p=0.034$ ) in the AT group when compared to the NT group after training.

Six subjects, two from each training group, had their anti-hypertension medication lowered by the trial physician because they were experiencing hypotensive episodes during their private daily routine.

The anthropometric results are presented in Table 4. The  $VO_{2peak}$  showed an increase only in the AT group proving the effectiveness of the training performed by this group during our experiment ( $p<0.05$ ).

The antioxidant enzymes were differentially altered in response to exercise (fig 2). SOD was higher ( $p=0.043$ ) in the AT group after training compared to baseline levels of this group and post exercise levels of other groups ( $p<0.05$ ). No alterations were revealed in both ST ( $p=0.630$ ) and CBT ( $p=0.614$ ) groups and in the NT group a drop ( $p=0.0525$ ) was observed, even though the baseline levels for this last group were higher ( $p=0.037$ ) than the others. CAT was elevated ( $p=0.002$ ) after training in AT group and displayed no alterations in the others groups. GSH-Px and TAS exhibited no alterations in any of the groups.

At the beginning of the study the levels of sulfhydryl groups were elevated in the NT group compared to the others groups, after the training these levels increased in the AT and CBT group ( $p=0.048$  and  $p=0.049$  respectively) and dropped ( $p=0.030$ ) in the NT group, showing no alterations in ST group. TBARS levels remained unchanged after training in all groups (fig 3). Nevertheless, it is important to report that at the onset of the study, TBARS levels were elevated in the ST ( $p=0.021$ ) and CBT ( $p=0.004$ ) groups compared to NT group. Following the intervention, only CBT remained higher ( $p=0.022$ ) than NT.

No significant differences induced by the exercise programs were observed in salivary nitrite levels in the NT, ST and CBT groups. The only significant finding was the higher nitrite concentration ( $p=0.011$ ) in AT group after the training program.

## Discussion

The beneficial effect of the exercise on the metabolic parameters and its influence on the generation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) likely depends on the mode, intensity and duration of the exercise on its energy requirements, levels of oxygen consumption and the mechanical stress applied to tissues<sup>[23,24]</sup>. The aim of the present study was to show the response of some metabolic control parameters, antioxidant activity and oxidative stress markers after 12 weeks of training following three different exercise protocols in T2DM subjects. We found that AT group displayed up regulation of the measured antioxidant enzymes (CAT and SOD), increased NO bioavailability and reduced oxidative stress. Improvements in metabolic control parameters occurred only for the ST group possibly due to the poor metabolic control of this group at baseline.

The training programs did not promote any additional benefits in anthropometric parameters except for AT group, which improved  $VO_{2peak}$ . T2DM subjects enrolled in exercise programs have shown positive responses of several metabolic control parameters such as HbA<sub>1c</sub>, FPG, TG and HDL-cholesterol<sup>[15,25]</sup>, although there is a lack of consensus related to the mode, duration and intensity of the exercise program required to benefit T2DM subjects<sup>[15,25,26]</sup>. In our study, we did not observe significant alterations on such parameters, except for the ST group, which had significantly higher baseline levels for FPG and HbA<sub>1c</sub> compared to other training groups. An explanation for the lack of effect on this parameter in other groups may relate to patient selection and the group allocation.

We randomly recruited patients from the diabetes clinic resulting in a heterogeneous population that we believe may be more representative of the overall T2DM patient population and the group distribution criteria did not consider basal levels of these parameters.

The beneficial effects observed in ST group do not allow us to conclude that strength training is more effective to improve the metabolic control in T2DM because there is evidence that the patients recruited may be responsible for these effects. For example, elevated FPG and HbA<sub>1c</sub> are associated with, and predictive of, improvements in blood glucose<sup>[26,27]</sup>.

The NO levels increase only in the AT group, and no alterations were observed to GSH-Px activity in any of the groups after the intervention. There is

evidence that one of the adaptations resulting from exercise is a strengthening of the body's antioxidant defenses, particularly the glutathione system, to regulate the increased oxidative stress.<sup>[28]</sup> The unaltered GSH-Px activity in our results can be explained by the fact that the activity of this peroxidase is age and training-status dependent. All of our subjects were sedentary at the beginning of the study, and there were no mean differences in the age of the groups in spite of a high age range within the groups. Previous work shows that NO can directly inactivate GSH-Px, resulting in increased intracellular peroxides that could lead to cellular damage<sup>[29,30]</sup>. GSH-Px activity presented here did not alter by exercise training nor NO inactivation.

The AT group also showed increased activities of SOD and CAT, which could contribute to prevent oxidative stress as demonstrated by increasing levels of sulfhydryl groups and steady TBARS levels. This increase in SOD activity could reduce the NO reaction with superoxide by removing it to form hydrogen peroxide<sup>[31]</sup>, which is then decomposed by CAT into water and oxygen gas. When superoxide anions are present at high concentration, they rapidly react with the newly created NO to form the strong oxidant peroxynitrite<sup>[31]</sup>, which is toxic to endothelial cells. This suggests that AT, with the volume and intensity used in the present training protocol, up regulates SOD activity, protecting endogenous nitric oxide from inactivation by scavenging superoxide anion. These events help minimize oxidative stress and the progressive microvascular and macrovascular<sup>[32]</sup> complications of diabetes. Furthermore, some authors demonstrate that NO is required for glucose uptake during exercise in individuals with T2DM compared with healthy controls<sup>[32,33]</sup>. In skeletal muscle and other insulin-sensitive tissues, inhibition of NO production may result in blunted glucose transport and subsequently, insulin resistance<sup>[32]</sup>.

The ST group did not lead to any regulation of antioxidant enzymes activities or alterations of oxidative stress markers or urate levels after training period. The CBT group, despite not having up regulation effect over antioxidant enzymes, managed to increase the levels of sulfhydryl groups. Some authors related that exercise generates oxidative stress only when it is exhaustive<sup>[34]</sup> and that non-exhaustive exercise causes an increase in the ROS production which can be compensated by the concurrent increase in antioxidant defenses<sup>[35]</sup>. Two theories have been suggested that resistance exercise could lead to an increase in the production of ROS. A widely supported hypothesis involves the ischemia

reperfusion injury<sup>[36]</sup> focused in the role of xanthine oxidase (XO)<sup>[37]</sup>, and the second hypothesis describes an inflammation event resulting from muscle tissue damage. We believe that the fear of injury leads some subjects to underachieve their respective training loads. This would cause subjects to perform strength exercise at intensity insufficient to increase free radical production that would overwhelm the antioxidant defenses and trigger its up regulation. Although we have not observed exercise-induced antioxidant response in ST and CBT group as described before, the exercise somehow prevented oxidative damage in these groups as NT group demonstrated reduced levels of sulfhydryl groups after the intervention.

The present study has some limitations. Although we used reliable tools to evaluate  $VO_{2peak}$ , most of the tests were stopped before voluntary exhaustion because of an elevation in the systolic blood pressure. The training duration and intensity we proposed could explain why exercise training had no significant effect on metabolic control parameters and body composition. Another limitation is the non-controlled diet that could influence the total antioxidant status, cholesterolemia and weight loss. Moreover, we did not measure the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) which could represent the endothelium-dependent vasodilation phenomenon. However, some authors<sup>[38,39]</sup> verified the saliva nitrite concentration predicts the plasma concentration of nitrite, one of the better indexes of the activity of eNOS<sup>[40]</sup>.

The T2DM pathophysiological processes may disrupt natural antioxidant defense mechanisms and exercise up regulates the antioxidant enzymes. Our work revealed that exercise training selectively increases antioxidant enzymes in the AT group offering additional protection against oxidative stress in T2DM subjects. We suggest that this response could be a result of transitory increases of ROS production mediated by exercise and that AT provide protection against constant oxidative attack that affects T2DM.

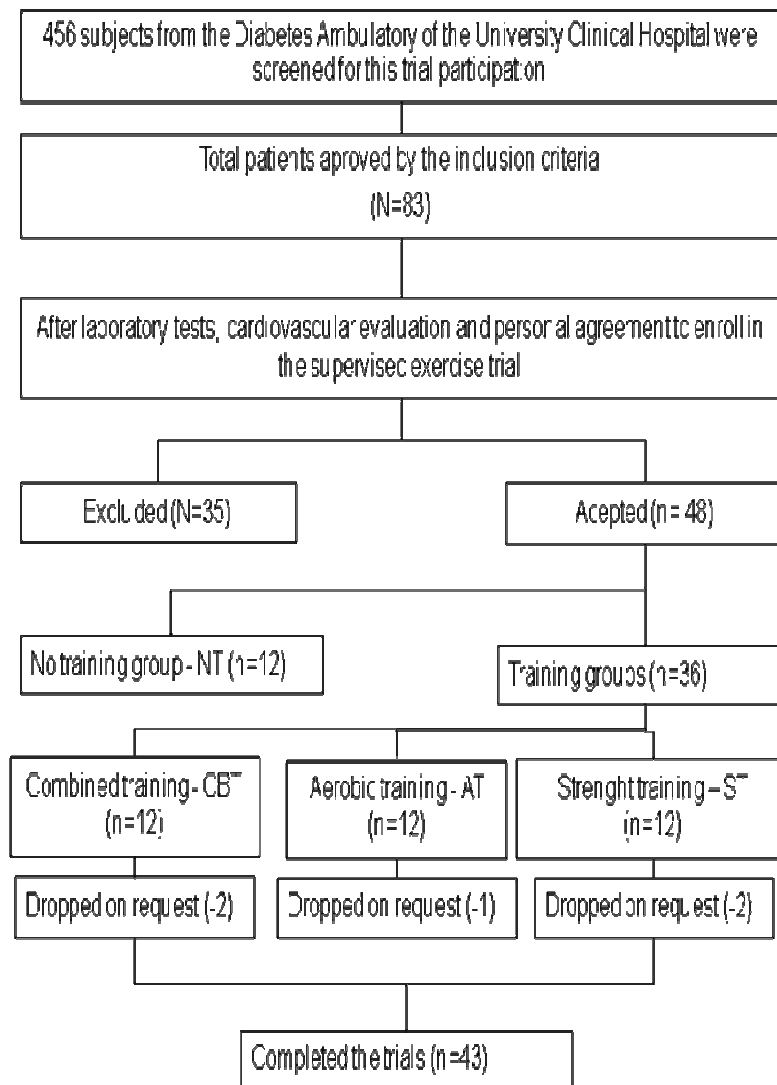
## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (PPSUS-FAPEMIG, EDT 3273/06). The authors thank the Laboratory of Clinical analysis of the University Clinical Hospital, Antonio Vicente

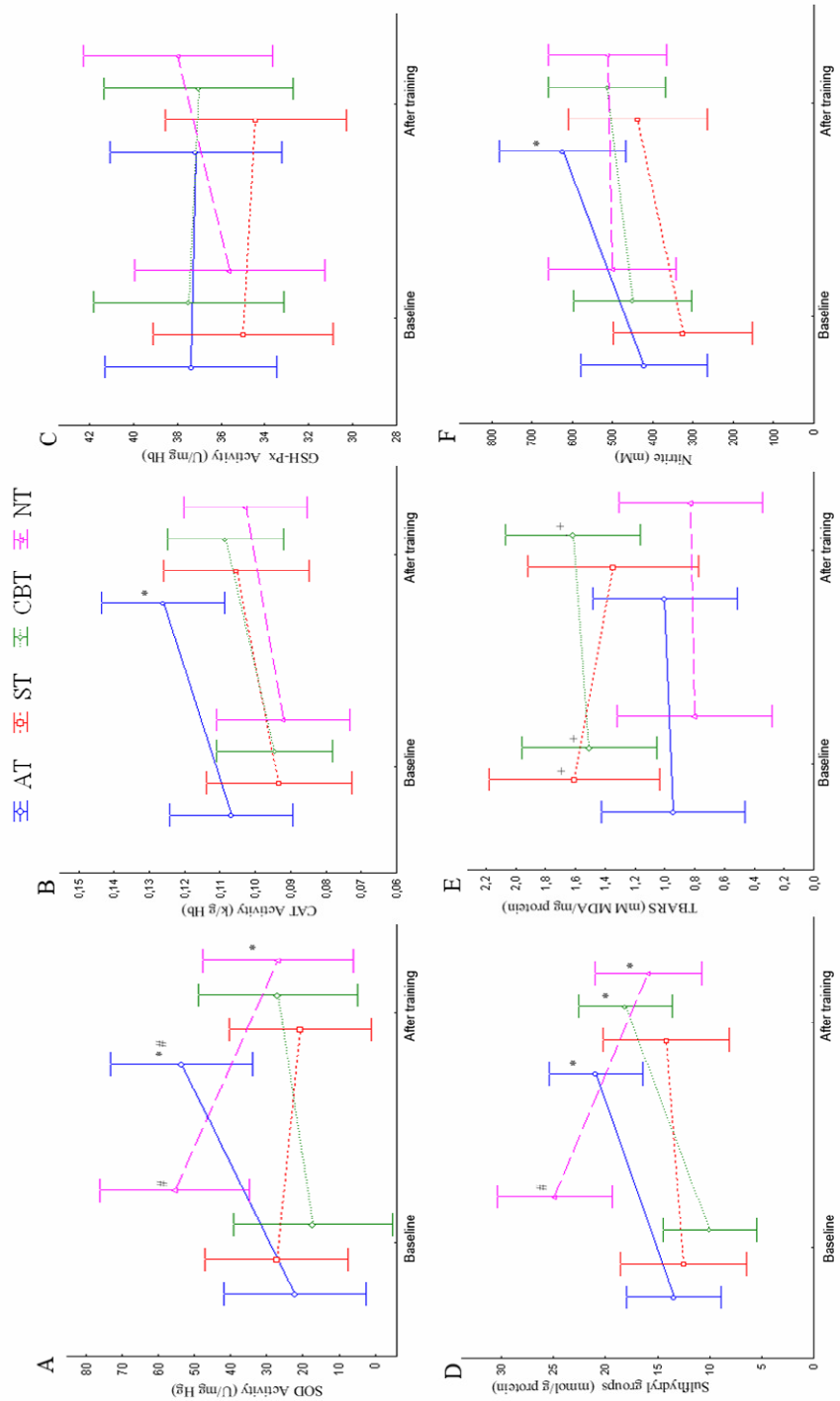
Mundim and Felipe Cezar Gonçalves for the technical assistance and all student fellows of the Laboratory.

## Figures

**Figure 1-** Study flow diagram for participant recruitment



**Figure 2-** Exercise effects over: A, superoxide dismutase (SOD), B, catalase (CAT), C, glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, D, sulfhydryl groups, E, thiobarbituric acid reacting substance (TBARS) and F, nitrite concentration. \*  $p < 0.05$  versus baseline of the same group; #  $p < 0.05$  versus others groups at the same time; +  $p < 0.05$  versus NT group at the same time (two-way repeated measures ANOVA).





## Tables

**Table 1-** Group allocation characteristics and drug therapies used by the subjects.

Group/characteristics	No Training Group (N=12)	Exercise group		
		Aerobic Training (N=11)	Strength Training (N=10)	Combined Training (N=10)
Gender (male/female)	4/8	5/6	4/6	4/6
Age (yr)	53.42 ± 9.82	52.09 ± 8.71	54.10 ± 8.94	57.90 ± 9.82
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.03 ± 4.90	29.30 ± 2.09	31.29 ± 4.08	31.24 ± 3.88
Diagnostic time (years)	5.25 ± 3.52	5.45 ± 4.12	7.70 ± 3.90	7.30 ± 4.97
Medication				
Sulfonylurea	2	5	7	5
Metformin	7	10	8	10
Sulfonylurea + metformin	2	5	5	5
DPP-4 inhibitors	¾	¾	¾	1
Lipid-lowering drug therapy	1	3	3	3
Antihypertensive	4	7	8	10

Values expressed as mean ± SD. Body Mass Index (BMI). There were no differences among the groups (one-way ANOVA).

**Table 2-** Aerobic training (AT), Strength training (ST) and Combined training (CBT) routines.

Groups/load	1st week			2nd week			3rd week			4th - 12th week		
	AT	ST	CBT	AT	ST	CBT	AT	ST	CBT	AT	ST	CBT
Volume (min)	20'	-	2 x 5'	30'	-	3 x 5'	40'	-	1x5' + 2x7,5'	50'	-	1 x 5' + 2 x 10'
Intensity	LT	-	LT	LT	-	LT	LT	-	LT	LT	-	LT
Volume (laps x rep)	-	2 x 15	1 x 15	-	4 x 15'	2 x 15	-	4 x 15	2 x 15	-	4 x 15	2 x 15
Intensity	-	50% RM	50% RM	-	50% RM	50% RM	-	8-12 RM	8-12 RM	-	8-12 RM	8-12 RM

Maximum repetition (RM); lactate threshold (LT).

**Table 3-** Clinical subjects' parameters are shown at baseline and after 12-wk exercise training.

Group/characteristics	No Training Group		Exercise Group					
	Baseline	After training	Aerobic Training		Strength Training		Combined Training	
			Baseline	After training	Baseline	After training	Baseline	After training
<b>Glycemic parameters</b>								
FPG (mg/dL)	148.81 ± 43.15	125.00 ± 20.58	146.6 ± 40.16	126.8 ± 35.94	194.22 ± 79.40 *	166.88 ± 60.59	154.60 ± 42.26	142.00 ± 36.69
PPG(mg/dL)	147.80 ± 43.35	131.10 ± 38.72	162.88 ± 67.07	122.22 ± 36.03	202.20 ± 116.16	191.11 ± 93.37	171.50 ± 85.89	151.66 ± 50.08
HbA1c (%)	7.04 ± 0.68	7.17 ± 0.70	7.35 ± 1.83	7.41 ± 1.48	8.51 ± 2.46 *	8.24 ± 2.13	7.60 ± 1.10	7.53 ± 1.04
<b>Lipid profile</b>								
Chl (mg/dL)	179.30 ± 32.20	168.50 ± 34.16	183.12 ± 23.09	165.75 ± 31.38	164.40 ± 30.10	153.62 ± 25.55	181.10 ± 29.23	178.75 ± 30.27
HDL-Chl (mg/dL)	45.13 ± 8.53	42.65 ± 7.75	47.15 ± 9.54	44.11 ± 7.74	39.38 ± 7.28	37.75 ± 3.61	46.13 ± 7.97	46.5 ± 7.57
LDL-Chl (mg/dL)	93.58 ± 36.88	94.70 ± 29.17	107.93 ± 21.77	97.31 ± 27.41	89.29 ± 31.07	84.75 ± 20.83	103.40 ± 17.85	106.12 ± 20.25
TGL (mg/dL)	201.90 ± 76.4	155.60 ± 61.68	141.87 ± 47.63	127.62 ± 55.22	236.40 ± 231.37	154.62 ± 76.43	157.90 ± 86.62	131.75 ± 68.71
<b>Kidney function markers</b>								
Na (mEq/L)	137.60 ± 2.11	140.33 ± 1.87	136.90 ± 2.42	139.18 ± 2.08	136.60 ± 2.63	138.50 ± 2.54	138.20 ± 2.04	124.74 ± 43.36
K (mEq/L)	3.96 ± 0.55	4.23 ± 0.53 #	4.21 ± 0.35	4.53 ± 0.37	3.92 ± 0.20	4.21 ± 0.28	4.27 ± 0.42*	4.38 ± 0.37
Urea (mg/dL)	34.73 ± 22.31	36.25 ± 13.76	29.27 ± 5.93	28.18 ± 6.36	31.00 ± 10.56	29.90 ± 8.82	34.40 ± 9.91	35.2 ± 9.40
PCr (mg/dL)	0.92 ± 0.37	0.86 ± 0.24	0.85 ± 0.23	0.82 ± 0.22	0.85 ± 0.17	0.79 ± 0.15	0.88 ± 0.17	0.90 ± 0.18
<b>Liver function markers</b>								
AST (U/L)	14.09 ± 7.41	15.08 ± 8.18	15.90 ± 5.16	15.18 ± 3.81	17.50 ± 14.77	15.4 ± 8.60	14.60 ± 8.13	14.50 ± 8.19
ALT (U/L)	34.64 ± 24.02	33.50 ± 22.83	40.40 ± 16.14	34.45 ± 7.43	36.20 ± 19.46	32.50 ± 12.29	30.60 ± 15.96	29.8 ± 15.83
Gamma-GT (U/L)	32.31 ± 13.51	30.7 ± 15.42	33.05 ± 29.14	32.42 ± 28.83	56.71 ± 76.42	50.43 ± 57.15	32.76 ± 19.74	31.00 ± 16.45
CK (U/L)	126.42 ± 105.09	119.5 ± 90.44	127.55 ± 38.29	120.18 ± 76.80	95.70 ± 48.91	85.9 ± 32.12	212.30 ± 275.13	130.60 ± 91.48
ALP (U/L)	88.37 ± 28.38	86.08 ± 28.32	109.33 ± 23.56	*104.54 ± 22.94*	104.88 ± 31.81*	*103.30 ± 21.12	92.10 ± 21.07	89.20 ± 19.24
<b>Hematological profile</b>								
RBC (x10 <sup>9</sup> /μL)	4.97 ± 0.38	4.85 ± 0.43	4.99 ± 0.47	4.91 ± 0.45	4.97 ± 0.30	4.81 ± 0.38	4.78 ± 0.52	4.70 ± 0.51
Hgb (g%)	14.74 ± 1.18	14.42 ± 1.35	14.77 ± 1.23	14.57 ± 1.19	14.85 ± 0.73	14.6 ± 1.00	14.31 ± 1.37	14.20 ± 1.11
Hct (%)	44.47 ± 3.36	43.37 ± 3.78	44.93 ± 3.81	44.09 ± 3.75	45.24 ± 2.26	43.83 ± 2.74	43.57 ± 4.07	42.74 ± 3.63
<b>Hormones</b>								
TSH (mU/L)	2.56 ± 1.52	2.54 ± 1.32	2.15 ± 1.20	2.48 ± 1.69	2.05 ± 1.37	2.06 ± 1.23	1.55 ± 1.15	2.06 ± 1.14
Cortisol (mcg/dL)	13.68 ± 6.46	14.56 ± 6.24	12.28 ± 3.59	10.63 ± 3.04*	15.74 ± 3.97	11.98 ± 3.71	13.25 ± 5.50	12.84 ± 3.96

Fasting plasma glucose (FPG); Post-prandial plasma glucose (PPG); Hemoglobin A1C (HbA1c); Plasma total cholesterol (Chl); Plasma triglyceride (TGL); Plasma creatinine (PCr); Aspartate aminotransferase (AST); Alanine aminotransferase (ALT); Gamma glutamyl transferase (gamma-GT); Creatine kinase (CK); Alkaline phosphatase (ALP); Red blood cell (RBC); Hemoglobin-(Hgb); Hematocrit (Hct); Thyroid stimulating hormone (TSH). \* p< 0.05 versus control group at the same time (two-way repeated measures ANOVA); Values expresses as mean ± SD.

**Table 4-** Biometric parameters before and after 12-week training.

Group/characteristics	No Training Group		Exercise Group					
	Baseline	After training	Aerobic Training		Strength Training		Combined Training	
			Baseline	After training	Baseline	After training	Baseline	After training
Body weight (kg)	75.80 ± 13.18	76.03 ± 12.85	76.56 ± 15.7	76.07 ± 16.16	77.98 ± 10.01	76.61 ± 10.78	78.20 ± 9.45	77.94 ± 9.37
Body fat (%)	36.45 ± 16.41	35.26 ± 12.65	37.12 ± 16.32	35.12 ± 14.58	36.41 ± 10.21	36.10 ± 11.25	34.21 ± 13.24	34.10 ± 09.14
Waist circumference (cm)	92.20 ± 13.12	91.35 ± 12.01	96.17 ± 10.42	94.31 ± 10.34	95.63 ± 7.90	93.98 ± 6.20	96.91 ± 7.85	94.80 ± 7.30
VO <sub>2peak</sub> (L/min)	1.63 ± 0.28	1.68 ± 0.35	1.60 ± 0.57	1.80 ± 0.69	1.34 ± 0.42	1.43 ± 0.44	1.52 ± 0.47	1.59 ± 0.38
VO <sub>2peak</sub> (ml/kg/min)	22.37 ± 3.64	22.82 ± 4.65	19.81 ± 4.24	23.03 ± 4.61*	17.03 ± 3.60	18.38 ± 3.84	19.58 ± 4.03	20.50 ± 2.77
Waist (cm)	92.21 ± 13.13	91.35 ± 12.02	96.17 ± 10.43	94.32 ± 10.35	95.64 ± 7.98	93.99 ± 6.21	96.91 ± 7.86	94.80 ± 7.31
WHR	0.98 ± 0.07	0.98 ± 0.10	1.01 ± 0.06	0.99 ± 0.06	0.85 ± 0.13	0.88 ± 0.12	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.08
SBP (mm Hg)	13.58 ± 1.62	12.42 ± 1.73	14.11 ± 1.36	13.11 ± 1.61	13.50 ± 2.00	12.50 ± 1.41	13.25 ± 1.58	12.5 ± 1.30
DBP (mm Hg)	8.50 ± 0.67	7.83 ± 1.03	8.88 ± 1.26	8.00 ± 1.00	8.37 ± 1.40	8.12 ± 0.99	8.62 ± 0.91	7.75 ± 0.46

Oxygen consumption plateau (VO<sub>2peak</sub>); Waist-to-hip ratio (WHR); Systolic Blood Pressure (SBP); Diastolic blood pressure (DBP). \*p<0.05 versus baseline values in the same group (two-way repeated measures ANOVA) Values expresses as mean ± SD.

## References

- 1 Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, et al. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:1563-74.
- 2 Zaltzberg H, Kanter Y, Aviram M, et al. Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM. *Isr Med Assoc J.* 1999;1:228-31.
- 3 Mossine VV, Linetsky M, Glinsky GV, et al. Superoxide free radical generation by Amadori compounds: the role of acyclic forms and metal ions. *Chem Res Toxicol.* 1999;12:230-6.
- 4 Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, et al. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab.* 2000;26:163-76.
- 5 Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986;246:501-14.
- 6 Palanduz S, Ademoglu E, Gokkusu C, et al. Plasma antioxidants and type 2 diabetes mellitus. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2001;109:309-18.
- 7 Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ.* 2006;174:801-9.
- 8 James DE, Kraegen EW, Chisholm DJ. Effect of exercise training on whole-body insulin sensitivity and responsiveness. *J Appl Physiol.* 1984;56:1217-22.
- 9 Node K, Kitakaze M, Sato H, et al. Effect of acute dynamic exercise on circulating plasma nitric oxide level and correlation to norepinephrine release in normal subjects. *Am J Cardiol.* 1997;79:526-8.
- 10 Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:126-31.

- 11 Ashton T, Young IS, Peters JR, et al. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol.* 1999;87:2032-6.
- 12 Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2003;89:14-20.
- 13 Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med.* 2009;8:1.
- 14 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl 1:S62-7.
- 15 Marcus RL, Smith S, Morrell G, et al. Comparison of combined aerobic and high-force eccentric resistance exercise with aerobic exercise only for people with type 2 diabetes mellitus. *Phys Ther.* 2008;88:1345-54.
- 16 Erdine S, Ari O, Zanchetti A, et al. ESH-ESC guidelines for the management of hypertension. *Herz.* 2006;31:331-8.
- 17 Guidelines for Exercise Testing and Prescription. . In: Wilkins LW, editor. *American College of Sport Medicine.* Philadelphia, PA 2000.
- 18 Nagler RM, Hershkovich O. Relationships between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile. *Arch Oral Biol.* 2005;50:7-16.
- 19 Bridges AB, Fisher TC, Scott N, et al. Circadian rhythm of white blood cell aggregation and free radical status in healthy volunteers. *Free Radic Res Commun.* 1992;16:89-97.
- 20 Aebi H, Suter H, Feinstein RN. Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice. *Biochem Genet.* 1968;2:245-51.
- 21 Faure P, JL L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier A, Cadet J, Kalnayanaraman B, et al., editors. *Analysis of free radicals in biology systems.* Basel: Birkhäuser Press, 1995:237-248.
- 22 Granger DL, Anstey NM, Miller WC, et al. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol.* 1999;301:49-61.

- 23 Jackson MJ. Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005;360:2285-91.
- 24 Volllaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*. 2005;35:1045-62.
- 25 Gordon LA, Morrison EY, McGrowder DA, et al. Effect of exercise therapy on lipid profile and oxidative stress indicators in patients with type 2 diabetes. *BMC Complement Altern Med*. 2008;8:21.
- 26 Cauza E, Hanusch-Enserer U, Strasser B, et al. The relative benefits of endurance and strength training on the metabolic factors and muscle function of people with type 2 diabetes mellitus. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005;86:1527-33.
- 27 Hordern MD, Cooney LM, Beller EM, et al. Determinants of changes in blood glucose response to short-term exercise training in patients with Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2008;115:273-81.
- 28 Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, et al. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol*. 1994;267:R439-45.
- 29 Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, et al. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem*. 2003;384:567-74.
- 30 Koh YH, Suzuki K, Che W, et al. Inactivation of glutathione peroxidase by NO leads to the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the induction of HB-EGF via c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in rat aortic smooth muscle cells. *FASEB J*. 2001;15:1472-4.
- 31 Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271:C1424-37.
- 32 Newsholme P, Homem De Bittencourt PI, C OH, et al. Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide. *Clin Sci (Lond)*. 118:341-9.
- 33 Kingwell BA, Formosa M, Muhlmann M, et al. Nitric oxide synthase inhibition reduces glucose uptake during exercise in individuals with type 2 diabetes more than in control subjects. *Diabetes*. 2002;51:2572-80.

- 34 Sastre J, Asensi M, Gasco E, et al. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol.* 1992;263:R992-5.
- 35 Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, et al. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life.* 2000;50:271-7.
- 36 McBride JM, Kraemer WJ, Triplett-McBride T, et al. Effect of resistance exercise on free radical production. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30:67-72.
- 37 Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol.* 2005;567:113-20.
- 38 Gaspar A, Juhasz P, Bagyi K. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of nitrite and nitrate in saliva. *J Chromatogr A.* 2005;1065:327-31.
- 39 Miyado T, Tanaka Y, Nagai H, et al. Simultaneous determination of nitrate and nitrite in biological fluids by capillary electrophoresis and preliminary study on their determination by microchip capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 2004;1051:185-91.
- 40 Lauer T, Heiss C, Balzer J, et al. Age-dependent endothelial dysfunction is associated with failure to increase plasma nitrite in response to exercise. *Basic Res Cardiol.* 2008;103:291-7.

## CAPÍTULO 2

### 4.0- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 4.1- Introdução

O exercício físico induz alterações bioquímicas nos sistemas corporais que modificam a composição do sangue e da saliva, entre outros fluidos corporais. Essas alterações podem ser usadas como indicadores da resposta fisiológica dos vários sistemas. Assim, o uso da saliva como fluido biológico para a detecção de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico está cada vez mais bem estabelecido. A coleta da saliva é não invasiva, indolor e possível por várias vezes ao dia, podendo fornecer avaliações precisas e confiáveis das flutuações diurnas, como por exemplo, de drogas e hormônios.

A concentração e o fluxo salivar são controlados pelo sistema nervoso autônomo e qualquer modificação da atividade do sistema nervoso autônomo pode ser observada indiretamente por alterações na secreção e composição salivar [1]. A concentração de determinados componentes salivares, como a  $\alpha$ -amilase reflete a resposta simpática enquanto que o cortisol e as citocinas representam a regulação imuno-endócrina da saliva. Juntos, o cortisol salivar e a  $\alpha$ -amilase podem descrever o estado neuro-endócrino de um indivíduo. Sendo assim, o exercício físico como ativador da atividade simpática altera os níveis de proteína total, eletrólitos, lactato, cortisol, óxido nítrico, peroxidase e imunoglobulinas salivares [1, 2]. Apesar de não haver evidências de que o fluxo salivar seja modificado por homônimos, as catecolaminas poderiam estar envolvidas no controle dos níveis de proteínas e eletrólitos na saliva [2]. Sabe-se que o impulso nervoso parassimpático cria o principal estímulo para a secreção salivar em geral [3], resultando em um maior fluxo salivar com baixos níveis de componentes orgânicos e inorgânicos [4, 5]. Por outro lado, a estimulação simpática produz saliva com baixo volume e altos níveis de proteínas e íons potássio [4, 6]. O sistema nervoso simpático tem sua atividade aumentada progressivamente com a intensidade do exercício [7], sendo o principal responsável pelas alterações causadas nos componentes salivares no decorrer do mesmo [8-10].

Desta forma, as modificações induzidas pelo exercício nos componentes da saliva fizeram desta amostra um meio para: 1) determinação do limiar anaeróbio [11, 12]; 2) controlar o restabelecimento das imunoglobulinas salivares, principalmente a IgA [10]; 3) avaliar o nível de estresse físico, como em situações de *overtraining* e estresse psicológico [13].

## **4.2- Efeito do exercício na secreção e composição salivar**

### **4.2.1- Taxa de fluxo**

A taxa de fluxo salivar parece modificar durante as atividades físicas [14, 15]. Contudo, as interpretações dos resultados desses estudos são algumas vezes difíceis devido às limitações de algumas metodologias, principalmente a respeito dos protocolos de exercícios e procedimentos na coleta da saliva.

Os dados disponíveis relativos à resposta do fluxo salivar durante exercícios intensos e de curta duração são controversos. Alguns autores relataram não encontrar nenhum efeito na taxa de fluxo salivar em resposta às séries curtas de exercício a intensidades máximas e submáximas [6, 15], ao passo que outros informaram um aumento de até duas vezes [14], ou até mesmo declíneos [16] em resposta a exercícios aeróbios intensos. Este último achado pode ser explicado pelo aumento da atividade simpática durante o exercício intenso, desde que a inervação simpática cause vasoconstrição nas arteríolas que irrigam as glândulas salivares, resultando em um baixo volume salivar.

Durante os exercícios prolongados de intensidades baixas e moderadas (abaixo de 60%  $VO_2$  máximo), a secreção salivar não parece ser significativamente modificada [6, 14]. Por outro lado, exercícios realizados em intensidades elevadas, acima do limiar anaeróbio diminuem a secreção salivar. Vários fatores associados com exercícios prolongados de alta intensidade, como o aumento da atividade  $\beta$ -adrenérgica, desidratação, evaporação da saliva pela hiperventilação, têm sido propostos para explicar a baixa secreção salivar durante altas cargas de trabalho.



#### 4.2.2- Composição salivar

A amilase é a proteína mais abundante na saliva, correspondendo de 10-20% do conteúdo protéico produzido pelas glândulas salivares e é principalmente sintetizada pela glândula parótida [17-19]. A análise eletroforética das proteínas da saliva da parótida de ratos [20] revelou que o conteúdo de proteínas presentes na glândula parótida é influenciado pelo tipo de estimulação (simpática ou parassimpática) usada para evocar a secreção. Existem evidências que a atividade da  $\alpha$ -amilase salivar aumenta em resposta ao exercício em esteira [21], exposição a altas temperaturas [22], corrida [23, 24], exposição ao frio [20] e ciclismo [20, 25]. Além da atividade da  $\alpha$ -amilase ser um possível indicador de estresse físico, a medida de sua atividade também é usada como indicador de estresse psicológico, uma vez que sua secreção é regulada pelo sistema nervoso simpático adrenomedular, através da ação da noraepinefrina sobre as glândulas salivares [19, 20, 26]. Sob condições de estresse, a atividade da  $\alpha$ -amilase aumenta mais rápido que as concentrações de cortisol, e após a retirada do fator estressante sua atividade também diminui mais rapidamente [13, 24, 27].

Gilman e colaboradores observaram uma maior atividade da  $\alpha$ -amilase durante o exercício que no repouso. Outros discutem que a  $\alpha$ -amilase é uma medida válida da atividade simpática [21]. Nexø e colaboradores verificaram um aumento médio de aproximadamente sete vezes na atividade da  $\alpha$ -amilase após duas horas de corrida (*cross-country*) [23]. A atividade da  $\alpha$ -amilase também aumentou após corrida e teste em bicicleta ergométrica [20]. Outro estudo verificou que os níveis de cloreto, fosfato, potássio,  $\alpha$ -amilase, hexosamina, ácido siálico e a peroxidase salivar apresentavam valores significativamente mais altos após a maratona, quando comparados com os níveis pré-exercício, e que a maioria dessas variáveis retornavam aos valores basais após uma hora de repouso [28].

Em um estudo com triatletas, Steerenberg e colaboradores reportaram que após uma competição olímpica, a saliva não estimulada apresentou valores mais elevados na concentração de proteína e atividade da  $\alpha$ -amilase, ao contrário, dos níveis de IgA que diminuíram, o que favorece às infecções no trato respiratório superior [24]. Por outro lado, sugere-se que o aumento da atividade da  $\alpha$ -amilase depois do exercício exerça um efeito protetor na saliva, uma vez que esta enzima inibe a fixação de bactérias nas superfícies orais [25].

Outro estudo avaliou oito atletas bem treinados durante 60 minutos de exercício cíclico de alta intensidade. A saliva total não estimulada foi coletada antes do exercício, imediatamente, 01, 02 e meia, 05 e 24 horas após o exercício. A concentração de IgA salivar não se alterou em nenhum momento após o exercício; entretanto, a atividade da  $\alpha$ -amilase aumentou cinco vezes e a concentração de proteína total três vezes em relação aos valores pré-exercício. Estes retornaram aos valores basais 02 horas e meia após a interrupção do teste [25]. Recentemente, Bishop e colaboradores avaliaram o uso da cafeína, prática comum entre esportistas, sobre a composição salivar após 90 minutos de ciclismo a 70% do  $VO_2$  máximo e verificaram que o grupo suplementado com cafeína aumentou os níveis de IgA, a atividade da  $\alpha$ -amilase e a taxa de secreção da saliva após o exercício, e nenhuma alteração foi observada na taxa de fluxo salivar. Acredita-se que estas respostas estejam diretamente ligadas ao aumento da atividade simpática induzida pelo exercício físico [29].

Vários estudos têm investigado o efeito do exercício de intensidade moderada na resposta imune da saliva em atletas recreacionais (indivíduos moderadamente treinados em lugar de atletas altamente treinados) usando esteira ou ciclo ergômetro. Essa linha de investigação é significativa, dado as implicações potenciais para a prescrição de programas de exercício moderado na comunidade geral [16, 30, 31]. Coletivamente, os resultados desses estudos sugerem que o exercício moderado não provoca nenhuma mudança significativa na concentração de imunoglobulina salivar em atletas recreacionais, com efeitos variáveis vistos depois de turnos de exercício exaustivo por atletas altamente treinados [32-35]. Estudos em atletas de elite revelaram que exercícios intensos de resistência aeróbia resultam em baixo nível de IgA salivar imediatamente após o treino. Além disso, a diminuição na concentração absoluta de IgA salivar foi observada em esquiadores de elite [24], nadadores [36, 37], maratonistas [38] e ciclistas [31, 39].

Ao contrário da IgA salivar, as outras classes de imunoglobulinas na saliva tem recebido pouca atenção. Alterações na concentração de IgG salivar não foram observadas em ciclistas [32] e nadadores de elite [37] e o IgM salivar diminuiu após o exercício na maioria dos estudos. A concentração de IgM salivar tem mostrado diminuir após sessões de treinamento em nadadores de elite [37] após duas horas de ciclismo exaustivo em ciclistas de competição [39]; em jogadores de hockey feminino durante a competição [40], em atletas recreacionais

após ciclismo realizado em intensidades supramáximas [16], porém permaneceu inalterada após treinamento em caiaquistas de elite [41].

Alguns estudos analisaram a resposta do lactato salivar induzido pelo exercício [14, 42]. Bardon e colaboradores demonstraram que o lactato salivar aumenta em indivíduos não treinados após exercício anaeróbio em bicicleta ergométrica [14]. Segura e colaboradores mostraram alta correlação entre os níveis de lactato na saliva e sangue durante exercício em cicloergômetro [42], indicando que a determinação do lactato pela saliva poderia ser usada como uma alternativa para a determinação do lactato sanguíneo na avaliação funcional de atletas.

Apesar dos variados trabalhos listados acima relacionarem o efeito mediado pelo exercício físico sobre alguns parâmetros salivares, até então não encontramos na literatura trabalhos que verificassem alterações no perfil eletroforético da saliva mediante esforço físico agudo.

#### **4.3- Limiar anaeróbio (LAN)**

O LAN é um parâmetro de aptidão aeróbia extensivamente utilizada em clínica médica [43], em pesquisas na área de fisiologia do exercício [44], na identificação de intensidade ótima de treinamento [45], na avaliação da capacidade aeróbia [46] e como indicador sensível das adaptações decorrentes do treinamento [47].

Wasserman e colaboradores usaram o termo “limiar anaeróbio” para descrever o ponto de inflexão do lactato, pois percebeu-se que o aumento súbito na concentração de lactato sanguíneo era devido à hipóxia do tecido muscular e pelo aumento da glicólise anaeróbia [48]. Alguns pesquisadores desafiam a concepção do LAN e a idéia de que a hipóxia muscular seja a única causa do limiar de lactato [49]. Mader e Heck aplicaram o termo “Limiar-aeróbio-anaeróbico” para identificar a intensidade do exercício correspondente à 4 mmol/L de lactato sanguíneo [50]. No mesmo ano, Davis e colaboradores encontraram uma alta correlação entre limiar ventilatório (LV) e limiar de lactato (LL) [51]. O LL foi definido como “o nível de  $VO_2$  durante o exercício no qual a energia aeróbia é suplementada por mecanismos anaeróbicos” [52], e redefinido como “o ponto de inflexão da lactatemia, caracterizado pela transição do aumento linear para

*exponencial*" [53]. Sendo assim, o LAN representa o ponto crítico no qual as modificações metabólicas provocam uma transição da demanda energética do exercício aeróbio para o anaeróbio. Essa transição para o metabolismo anaeróbio durante a contração muscular envolve uma variedade de fatores, tais como: o tipo de fibra muscular recrutada, mobilização de combustível, resposta hormonal, cardio-circulatório e parâmetros respiratórios [49, 54, 55].

Alguns estudos têm relacionado as concentrações de lactato sanguíneo com as concentrações de catecolaminas plasmáticas (adrenalina e noradrenalina), sugerindo que o ponto de inflexão do lactato sanguíneo ocorra simultaneamente com o das catecolaminas, durante o teste de esforço progressivo, validando o método de mensuração das catecolaminas na determinação do LL [55-57]. Schneider e colaboradores examinaram a resposta das catecolaminas plasmáticas e lactato sanguíneo em exercício de perna e braço, e concluíram que o *breakpoint* da concentração da epinefrina plasmática ocorre de maneira idêntica e simultaneamente com o LL [57]. Assim, com a descoberta do aumento da atividade adrenérgica durante um exercício submáximo com incremento de cargas surgiu o limiar de epinefrina (LAN<sub>epi</sub>), sendo "o ponto de aumento da concentração de epinefrina plasmática" [58, 59].

O LAN pode ser detectado através de diversos protocolos de testes crescentes com estágios variados de duração, sendo que a intensidade na qual ocorre o ponto de inflexão na curva do lactato sanguíneo é a intensidade do LAN [53]. O mesmo ponto é definido por Farrell e colaboradores como OPLA (*Onset of Plasma Lactate Accumulation*). Entretanto, Coyle e colaboradores definiram como LAN a intensidade de exercício na qual a concentração de lactato aumenta 1 mM acima da linha de base ( $\Delta$  1mM) [60]. Por outro lado, outros estudiosos preferem utilizar as concentrações fixas de lactato (4 mmol/L) nesta relação [50].

Algumas metodologias têm sido propostas para estimar o limiar anaeróbio, sendo algumas invasivas e outras não invasivas. Dentre os métodos invasivos estão a análise do lactato sanguíneo [61], dosagens glicêmicas [62], análise das catecolaminas plasmáticas [58]; e dentre as não invasivas estão as análises ventilatórias [46] salivares [9, 11] e as eletromiográficas [63]. É importante ressaltar que tanto as definições quanto os protocolos de teste utilizados afetam a interpretação da resposta do lactato sanguíneo ao exercício incremental [64].

#### 4.3.1- Biomarcadores salivares do limiar anaeróbio

Baseada na alta correlação encontrada entre os níveis de epinefrina plasmática e a atividade da  $\alpha$ -amilase durante o exercício físico [20], a análise de componentes salivares, tais como eletrólitos, proteína total e atividade da  $\alpha$ -amilase para detectar o limiar salivar ( $LAN_{sa}$ ) tem sido usada como alternativa não invasiva na determinação da intensidade de exercício correspondente ao LAN [9, 11, 20, 65].

Chatterton e colaboradores concluíram que a concentração da  $\alpha$ -amilase salivar é prediativa de níveis plasmáticos de catecolaminas, particularmente da epinefrina, sob uma variedade de condições de estresse e pode ser um meio mais direto e mais simples para mensurar a atividade das catecolaminas do que o batimento cardíaco [20]. Calvo e colaboradores determinaram o LAN pela análise da concentração de  $\alpha$ -amilase salivar durante teste de exercício em laboratório e verificaram que o limiar da  $\alpha$ -amilase salivar e do LL apresentaram alta correlação quando expressos em relação a velocidade de corrida [11]. Assim, Chicharro e colaboradores definiram limiar anaeróbio da amilase salivar ( $LAN_{amy}$ ) como o momento durante o exercício no qual os níveis da  $\alpha$ -amilase salivar começam a aumentar acima do basal [9]. No mesmo aspecto, as alterações das concentrações de eletrólitos na saliva durante o exercício físico em ciclo ergômetro indicaram que os níveis dos íons sódio e cloro são altamente correlacionados com o LL [9].

Recentemente, Bortolini e colaboradores reportaram um aumento não linear na concentração da proteína total salivar em indivíduos submetidos a um teste de esforço máximo. O limiar da proteína apresentou alta correlação com o LL e nenhuma diferença foi observada entre os limiares individuais de proteína total salivar e lactato. Segundo os autores a concentração de proteína total na saliva fornece uma matriz conveniente e não invasiva para a determinação do LAN durante teste de esforço incremental [12].

Assim, o uso de biomarcadores salivares pode ser particularmente útil em ambientes esportivos, principalmente em estudos de campo onde a avaliação da atividade da  $\alpha$ -amilase através da saliva, como um indicador de funcionamento autônomo, pode se apresentar como um método rápido, não invasivo e eficiente

na avaliação, prescrição e acompanhamento de atletas ou da população de um modo geral.

#### **4.4- Recomendações metodológicas para coleta da saliva**

Diante do crescente número de trabalhos utilizando a saliva como material biológico em ambientes esportivos faz-se necessário estabelecer protocolos padronizados de coleta e armazenamento das amostras, pois a diversidade metodológica encontrada nos poucos trabalhos existentes constitui uma dificuldade na interpretação e comparação dos resultados obtidos.

##### **4.4.1- Recomendações para a coleta da saliva**

Algumas medidas cautelosas devem ser tomadas no que diz respeito a realização da coleta da saliva: a amostra deve ser sempre colhida entre 09:00 e 10:00 da manhã e sempre que possível utilizar voluntários do mesmo sexo para reduzir a interferência do ciclo circadiano e do gênero; os voluntários devem ser informados para que não façam exercício físico pelo menos 24 horas antes da coleta e não comam, bebam, fumem ou escovem os dentes por pelo menos uma hora; durante a coleta, o ambiente deve estar bem ventilado e os voluntários sentados de forma ereta; as coletas correspondentes aos níveis basais devem preconizar o estado relaxado de pelo menos 5 minutos [13]; os voluntários, antes da coleta, devem lavar a boca com água limpa para evitar a contaminação da amostra salivar com restos de alimentos e para evitar a ativação do fluxo salivar ou a produção de proteína por estímulos gustativos; não é recomendado o uso de ácido cítrico ou outros componentes ácidos para estimulação da salivação, pois estes interferem nos resultados do ensaio por alterarem o pH da amostra [66].

##### **4.4.2- Coleta da saliva (Salivette® e método de cuspe)**

Em geral, as técnicas para coleta da saliva humana podem ser categorizadas em amostras de saliva total vs coleta de amostras de glândulas salivares específicas (parótida, submandibular e sublingual) ou na coleta da saliva estimulada vs não estimulada. Outra distinção pode ser feita baseada nas

técnicas de coleta que usam materiais absorventes vs técnicas em que a saliva é drenada ou cuspidada.

A técnica de coleta mais utilizada usando material absorvente é provavelmente a do salivete<sup>®</sup>. Este consiste de um tubo plástico que contém um rolo de algodão de alta absorção que deve ser removido e colocado na boca em um intervalo de tempo que varia de um a cinco minutos. Em alguns protocolos experimentais, os participantes são instruídos a mastigar o algodão para estimular o fluxo salivar. A recuperação da amostra de saliva absorvida se dá pela centrifugação deste tubo, obtendo-se uma amostra clara e pronta para a análise [67]. Este método tem sido bastante usado em pesquisas de psiconeuroendocrinologia [67] e como dispositivo de coleta para monitorar drogas bloqueadoras de  $\beta$ -adrenoceptores na saliva, mostrando-se eficaz, prontamente acessível e livre dos riscos de infecção [68].

Harmon e colaboradores demonstraram recentemente que amostras de saliva coletadas colocando o rolo de algodão em diferentes áreas da boca resultaram em resultados diferentes [69]. Assim, recomenda-se instruir os usuários desse método a colocar o algodão em um local específico ou fazer movimentos circulares a fim de obter amostras de saliva provenientes das três glândulas salivares [13].

A desvantagem das coletas usando salivetes<sup>®</sup> ou outras técnicas de coleta baseadas em material absorvente é que a estimulação do fluxo salivar não pode ser completamente excluída devido à presença do estímulo mecânico na boca, mesmo quando os voluntários são orientados a não mastigar o rolo de algodão [70]. Além disso, baixos volumes são dificilmente recuperados a partir de algodão [71].

O método da expectoração ou método de cuspe é um método geralmente utilizado para mensuração do fluxo salivar, em que a saliva que é expelida por uma cuspidada e coletada em um tubo graduado [70]. Este método tem sido usado durante testes de esforço máximo, porém a saliva necessita ser estimulada principalmente nos últimos estágios onde os voluntários experimentam a sensação de boca seca.

#### **4.4.3- Manipulação e armazenamento de amostras de saliva**

Algumas questões precisam ser consideradas quanto ao uso das amostras da saliva: “por quanto tempo a saliva pode ser mantida em temperatura ambiente ou geladeira antes de ser congelada?”, “por quanto tempo elas podem ser mantidas congeladas à -20 ou -80°C?”, “a atividade da  $\alpha$ -amilase resiste a muitos ciclos de congelamento e descongelamento?”.

Um estudo recente mostrou que quando se trata de  $\alpha$ -amilase, sua atividade é estável à temperatura ambiente (22 °C), e mesmo em temperaturas mais elevadas (37 °C) por até três semanas, sem perda significativa de atividade [72]. Granger e colaboradores reportaram que a  $\alpha$ -amilase é estável à temperatura ambiente e à 48 °C por pelo menos quatro dias [73]. Estes dados têm implicações importantes no que dizem respeito ao armazenamento e transporte da amostra, especificamente quando a saliva está sendo coletada em campo, pois não é necessário refrigerar ou congelar as amostras durante o dia da coleta, antes ou durante o transporte para o laboratório de análises [13].

Para o armazenamento a longo prazo, as amostras de saliva devem ser congeladas a -20 °C ou temperaturas inferiores. A saliva total pode ser congelada no salivette® não centrifugado ou transferida para recipientes que suportam pelo menos 1.5mL. Também foi demonstrado que a atividade  $\alpha$ -amilase não é afetada por ciclos de congelamento e descongelamento [73].



## 5.0- REFERÊNCIAS

1. Denniss, A.R., Schneyer, L.H., Sukanthapree, C., and Young, J.A., Actions of adrenergic agonists on isolated excretory ducts of submandibular glands. ***Am J Physiol***, 1978; 235: p. F548-56.
2. Anderson, L.C., Garrett, J.R., Johnson, D.A., Kauffman, D.L., Keller, P.J., and Thulin, A., Influence of circulating catecholamines on protein secretion into rat parotid saliva during parasympathetic stimulation. ***J Physiol***, 1984; 352: p. 163-71.
3. Schneyer, L.H., Young, J.A., and Schneyer, C.A., Salivary secretion of electrolytes. ***Physiol Rev***, 1972; 52: p. 720-77.
4. Baum, B.J., Neurotransmitter control of secretion. ***J Dent Res***, 1987; 66 Spec No: p. 628-32.
5. Asking, B. and Emmelin, N., Amylase in parotid saliva of rats after sympathetic nervous decentralization. ***Arch Oral Biol***, 1985; 30: p. 337-9.
6. Pilardeau, P., Richalet, J.P., Bouissou, P., Vaysse, J., Larmignat, P., and Boom, A., Saliva flow and composition in humans exposed to acute altitude hypoxia. ***Eur J Appl Physiol Occup Physiol***, 1990; 59: p. 450-3.
7. Stainsby, W.N. and Brooks, G.A., Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. ***Exerc Sport Sci Rev***, 1990; 18: p. 29-63.
8. Bishop, N.C. and Gleeson, M., Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. ***Front Biosci***, 2009; 14: p. 4444-56.
9. Chicharro, J.L., Lucia, A., Perez, M., Vaquero, A.F., and Urena, R., Saliva composition and exercise. ***Sports Med***, 1998; 26: p. 17-27.
10. Walsh, N.P., Bishop, N.C., Blackwell, J., Wierzbicki, S.G., and Montague, J.C., Salivary IgA response to prolonged exercise in a cold environment in trained cyclists. ***Med Sci Sports Exerc***, 2002; 34: p. 1632-7.
11. Calvo, F., Chicharro, J.L., Bandres, F., Lucia, A., Perez, M., Alvarez, J., Mojares, L.L., Vaquero, A.F., and Legido, J.C., Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. ***Can J Appl Physiol***, 1997; 22: p. 553-61.
12. Bortolini, M.J., De Agostini, G.G., Reis, I.T., Lamounier, R.P., Blumberg, J.B., and Espindola, F.S., Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. ***Res Q Exerc Sport***, 2009; 80: p. 604-10.

13. Nater, U.M. and Rohleder, N., Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology*, 2009; 34: p. 486-96.
14. Bardon, A., Ceder, O., and Kollberg, H., Cystic fibrosis-like changes in saliva of healthy persons subjected to anaerobic exercise. *Clin Chim Acta*, 1983; 133: p. 311-6.
15. Dawes, C., The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. *J Physiol*, 1981; 320: p. 139-48.
16. MacKinnon, L.T. and Jenkins, D.G., Decreased salivary immunoglobulins after intense interval exercise before and after training. *Med Sci Sports Exerc*, 1993; 25: p. 678-83.
17. Speirs, R.L., Herring, J., Cooper, W.D., Hardy, C.C., and Hind, C.R., The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland. *Arch Oral Biol*, 1974; 19: p. 747-52.
18. Turner, R.J. and Sugiya, H., Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis*, 2002; 8: p. 3-11.
19. Nater, U.M., La Marca, R., Florin, L., Moses, A., Langhans, W., Koller, M.M., and Ehlert, U., Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity -- associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology*, 2006; 31: p. 49-58.
20. Chatterton, R.T., Jr., Vogelsong, K.M., Lu, Y.C., Ellman, A.B., and Hudgens, G.A., Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol*, 1996; 16: p. 433-48.
21. Gilman, S., Thornton, R., Miller, D., and Biersner, R., Effects of exercise stress on parotid gland secretion. *Horm Metab Res*, 1979; 11: p. 454.
22. Gilman, S.C., Fischer, G.J., Biersner, R.J., Thornton, R.D., and Miller, D.A., Human parotid alpha-amylase secretion as a function of chronic hyperbaric exposure. *Undersea Biomed Res*, 1979; 6: p. 303-7.
23. Nexø, E., Hansen, M.R., and Konradsen, L., Human salivary epidermal growth factor, haptocorrin and amylase before and after prolonged exercise. *Scand J Clin Lab Invest*, 1988; 48: p. 269-73.
24. Steerenberg, P.A., van Asperen, I.A., van Nieuw Amerongen, A., Biewenga, A., Mol, D., and Medema, G.J., Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. *Eur J Oral Sci*, 1997; 105: p. 305-9.

25. Walsh, N.P., Blannin, A.K., Clark, A.M., Cook, L., Robson, P.J., and Gleeson, M., The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. ***J Sports Sci***, 1999; 17: p. 129-34.
26. Yamaguchi, M., Kanemori, T., Kanemaru, M., Takai, N., Mizuno, Y., and Yoshida, H., Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. ***Biosens Bioelectron***, 2004; 20: p. 491-7.
27. Shirtcliff, E.A., Granger, D.A., Schwartz, E., and Curran, M.J., Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. ***Psychoneuroendocrinology***, 2001; 26: p. 165-73.
28. Ljungberg, G., Ericson, T., Ekblom, B., and Birkhed, D., Saliva and marathon running. ***Scand J Med Sci Sports***, 1997; 7: p. 214-9.
29. Bishop, N.C., Walker, G.J., Scanlon, G.A., Richards, S., and Rogers, E., Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion. ***Med Sci Sports Exerc***, 2006; 38: p. 513-9.
30. McDowell, S.L., Hughes, R.A., Hughes, R.J., Housh, D.J., Housh, T.J., and Johnson, G.O., The effect of exhaustive exercise on salivary immunoglobulin A. ***J Sports Med Phys Fitness***, 1992; 32: p. 412-5.
31. Gleeson, M., McDonald, W.A., Pyne, D.B., Clancy, R.L., Cripps, A.W., Francis, J.L., and Fricker, P.A., Immune status and respiratory illness for elite swimmers during a 12-week training cycle. ***Int J Sports Med***, 2000; 21: p. 302-7.
32. Mackinnon, L.T. and Hooper, S., Mucosal (secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during overtraining. ***Int J Sports Med***, 1994; 15 Suppl 3: p. S179-83.
33. Blannin, A.K., Robson, P.J., Walsh, N.P., Clark, A.M., Glennon, L., and 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: p. 547-52.
34. McDowell, S.L., Chaloa, K., Housh, T.J., Tharp, G.D., and Johnson, G.O., The effect of exercise intensity and duration on salivary immunoglobulin A. ***Eur J Appl Physiol Occup Physiol***, 1991; 63: p. 108-11.
35. Bratthall, D. and Widerstrom, L., Ups and downs for salivary IgA. ***Scand J Dent Res***, 1985; 93: p. 128-34.
36. Tharp, G.D. and Barnes, M.W., Reduction of saliva immunoglobulin levels by swim training. ***Eur J Appl Physiol Occup Physiol***, 1990; 60: p. 61-4.

37. Gleeson, M., Cripps, A.W., and Clancy, R.L., Modifiers of the human mucosal immune system. *Immunol Cell Biol*, 1995; 73: p. 397-404.
38. Nieman, D.C., Henson, D.A., Fagoaga, O.R., Utter, A.C., Vinci, D.M., Davis, J.M., and Nehlsen-Cannarella, S.L., Change in salivary IgA following a competitive marathon race. *Int J Sports Med*, 2002; 23: p. 69-75.
39. Mackinnon, L.T., Immunity in athletes. *Int J Sports Med*, 1997; 18 Suppl 1: p. S62-8.
40. Husband, A.J., *Behaviour and immunity*, ed. C. Press. 1992, Newcastle.
41. Mackinnon, L.T., Ginn, E., and Seymour, G.J., Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1993; 67: p. 180-4.
42. Segura, R., Javierre, C., Ventura, J.L., Lizarraga, M.A., Campos, B., and Garrido, E., A new approach to the assessment of anaerobic metabolism: measurement of lactate in saliva. *Br J Sports Med*, 1996; 30: p. 305-9.
43. Heck, H., Mader, A., Hess, G., Mucke, S., Muller, R., and Hollmann, W., Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med*, 1985; 6: p. 117-30.
44. Schuetz, W., Traeger, K., Anhaeupl, T., Schanda, S., Rager, C., Vogt, J., and Georgieff, M., Adjustment of metabolism, catecholamines and beta-adrenoceptors to 90 min of cycle ergometry. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1995; 70: p. 81-7.
45. Dwyer, J. and Bybee, R., Heart rate indices of the anaerobic threshold. *Med Sci Sports Exerc*, 1983; 15: p. 72-6.
46. Wasserman, K. and McIlroy, M.B., Detecting the Threshold of Anaerobic Metabolism in Cardiac Patients during Exercise. *Am J Cardiol*, 1964; 14: p. 844-52.
47. Carter, H., Jones, A.M., and Doust, J.H., Effect of 6 weeks of endurance training on the lactate minimum speed. *J Sports Sci*, 1999; 17: p. 957-67.
48. Wasserman, K., Whipp, B.J., Koyl, S.N., and Beaver, W.L., Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol*, 1973; 35: p. 236-43.
49. Brooks, G.A., Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. *Med Sci Sports Exerc*, 1985; 17: p. 22-34.
50. Mader, A. and Heck, H., A theory of the metabolic origin of "anaerobic threshold". *Int J Sports Med*, 1986; 7 Suppl 1: p. 45-65.

51. Davis, J.A., Vodak, P., Wilmore, J.H., Vodak, J., and Kurtz, P., Anaerobic threshold and maximal aerobic power for three modes of exercise. ***J Appl Physiol***, 1976; 41: p. 544-50.
52. Wasserman, K., The anaerobic threshold measurement in exercise testing. ***Clin Chest Med***, 1984; 5: p. 77-88.
53. Wasserman, K., Hansen, J.E., Sue, D.Y., and Whipp, B.J., *Principles of exercise testing and interpretation*. 1987 Philadelphia: Lea & Febiger.
54. Katz, A. and Sahlin, K., Role of oxygen in regulation of glycolysis and lactate production in human skeletal muscle. ***Exerc Sport Sci Rev***, 1990; 18: p. 1-28.
55. Podolin, D.A., Munger, P.A., and Mazzeo, R.S., Plasma catecholamine and lactate response during graded exercise with varied glycogen conditions. ***J Appl Physiol***, 1991; 71: p. 1427-33.
56. Martinez-Madrigal, F. and Micheau, C., Histology of the major salivary glands. ***Am J Surg Pathol***, 1989; 13: p. 879-99.
57. Schneider, D.A., McLellan, T.M., and Gass, G.C., Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. ***Med Sci Sports Exerc***, 2000; 32: p. 608-13.
58. Mazzeo, R.S. and Marshall, P., Influence of plasma catecholamines on the lactate threshold during graded exercise. ***J Appl Physiol***, 1989; 67: p. 1319-22.
59. Schneider, D.A., McGuiggin, M.E., and Kamimori, G.H., A comparison of the blood lactate and plasma catecholamine thresholds in untrained male subjects. ***Int J Sports Med***, 1992; 13: p. 562-6.
60. Coyle, E.F., Hagberg, J.M., Hurley, B.F., Martin, W.H., Ehsani, A.A., and Holloszy, J.O., Carbohydrate feeding during prolonged strenuous exercise can delay fatigue. ***J Appl Physiol***, 1983; 55: p. 230-5.
61. Kindermann, W., Simon, G., and Keul, J., The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. ***Eur J Appl Physiol Occup Physiol***, 1979; 42: p. 25-34.
62. Simões, H.G., Capbell, C.S.G., Baldissera, V., Denadai, B.S., and Kokubun, E., Determinação do limiar anaeróbico por meio de dosagens glicêmicas e lactacidêmicas em teste de pista para corredores. ***Revista Paulista de Educação Física***, 1998; 12: p. 17-30.

63. Lucia, A., Sanchez, O., Carvajal, A., and Chicharro, J.L., Analysis of the aerobic-anaerobic transition in elite cyclists during incremental exercise with the use of electromyography. *Br J Sports Med*, 1999; 33: p. 178-85.
64. Weltman, A. and Champaign, I., *The blood lactate response to exercise.*, ed. H. Kinetics. 1995, Champaign.
65. Chicharro, J.L., Legido, J.C., Alvarez, J., Serratosa, L., Bandres, F., and Gamella, C., Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic threshold determination. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1994; 68: p. 214-8.
66. Navazesh, M. and Kumar, S.K., Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc*, 2008; 139 Suppl: p. 35S-40S.
67. Strazdins, L., Meyerkort, S., Brent, V., D'Souza, R.M., Broom, D.H., and Kyd, J.M., Impact of saliva collection methods on sIgA and cortisol assays and acceptability to participants. *J Immunol Methods*, 2005; 307: p. 167-71.
68. Park, J.R., Kim, M.H., Woo, J., Lee, S.J., and Song, K.E., [Measurement of amylase in saliva collected by salivette]. *Korean J Lab Med*, 2008; 28: p. 438-43.
69. Harmon, A.G., Towe-Goodman, N.R., Fortunato, C.K., and Granger, D.A., Differences in saliva collection location and disparities in baseline and diurnal rhythms of alpha-amylase: a preliminary note of caution. *Horm Behav*, 2008; 54: p. 592-6.
70. Navazesh, M., Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci*, 1993; 694: p. 72-7.
71. Zimmermann, L.K., A salivary collection method for young children. *Psychophysiology*, 2008; 45: p. 353-5.
72. DeCaro, J.A., Methodological considerations in the use of salivary alpha-amylase as a stress marker in field research. *Am J Hum Biol*, 2008; 20: p. 617-9.
73. Granger, D.A., Kivlighan, K.T., Blair, C., El-Sheik, M., Mize, J., Lisonbee, J.A., Buckhalt, J.A., and Stroud, L.R., Integrating the measurement of salivary alpha-amylase into studies of child health, development, and social relationships. *Journal of Social and Personal Relationships* 2006; 23: p. 267-290.

## **6.0- ARTIGO CIENTÍFICO**

### **Changes in the salivary biomarkers induced by an effort test**

Oliveira, VN<sup>1</sup>; Bessa, A<sup>1</sup>; Lamounier, RPMS<sup>1</sup>; Santana, MG<sup>2</sup>; Mello, MT<sup>2</sup>; Espindola, FS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, UFU, <sup>2</sup> Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

## **ABSTRACT**

Physical exercise induces biochemical changes in the body that modify analytes in blood and saliva among other body fluids. Many of these salivary protein analytes and their functions remain uncharacterized. This study analyzed the effect of an incremental effort test on the salivary protein profile to determine whether any specific protein is altered in response to such stress. We also measured thresholds of salivary alpha amylase, total salivary protein and blood lactate and searched for correlations among them. Twelve male cyclists underwent a progressive test in which blood and saliva samples were collected simultaneously at each stage. The salivary total protein profile revealed that physical exercise primarily affects the polypeptide corresponding to salivary alpha-amylase, the concentration of which increased markedly during the test. We observed thresholds of salivary alpha-amylase (sAAT), total salivary protein (PAT) and blood lactate (BLT) in 58%, 83% and 100% of our sample, respectively. Pearson's correlation indicates, during the test, a strong and significant association between sAAT and BLT ( $r= 0.84$   $p<0.05$ ), sAAT and PAT ( $r= 0.83$   $p<0.05$ ) and BLT and PAT ( $r= 0.90$   $p<0.05$ ). The increased expression of the salivary alpha-amylase (sAA) polypeptide suggests that sAA is the main protein responsible for the increase in total protein concentration of whole saliva. Therefore, monitoring total protein concentration is an efficient tool and an alternative noninvasive biochemical method for determining exercise intensity.

**Key words:** Exercise; Lactate; Salivary alpha-amylase anaerobic threshold; Electrophoresis.



## INTRODUCTION

Traditional biochemical approaches for studying individual proteins have provided structures and functions of a number of major salivary proteins. However, many salivary proteins and their functions remain uncharacterized [17]. Physical exercise induces biochemical changes in the body, which modify blood and saliva analytes among other body fluids [2,10,18]. Based on these observations, analyzing changes in the salivary protein profile may help to identify novel biomarkers for work load, recovery and injury.

Measuring salivary analytes, such as total protein, alpha-amylase, electrolytes, lactate and catecholamines may represent a noninvasive method to determine the relationship between intensity of exercise and the blood lactate threshold (BLT) [4,6,9]. The BLT is characterized by the transition from a linear to an exponential increase in blood lactate concentration, and its measurement has been of great use in both experimental and routine studies of physical performance [21,30]. Previous studies have shown that a salivary threshold exists beyond which a continuous increase in these analytes may serve as a salivary biomarker of exercise intensity [4,6,9].

Activity of the sympathetic nervous system increases progressively with intensity of exercise [32], altering some salivary components [3,10,38]. Bortolini et al.[4] investigated whether the total protein concentration of whole saliva (TPWS) reflects the anaerobic threshold during an incremental exercise test, and they observed a profound correlation between the total salivary protein threshold (PAT) and the BLT. Analysis of salivary proteins in rat parotid saliva revealed that the protein content in the parotid is markedly influenced by the type of stimulation (sympathetic or parasympathetic) used to induce secretion [1].

It has been proposed that salivary alpha-amylase (sAA) activity is regulated by the sympathetic-adrenal medullary (SAM) system through the action of norepinephrine on the salivary glands [8,34,40]. Activity of sAA increases in response to exercise on a treadmill [12], running [24,33] and cycling [8,37]. Furthermore, sAA assessment has been proposed as a useful tool for evaluating psychological stress [13,25,35,36]. Under exercise-induced stress, sAA activity increases faster than blood cortisol levels, and it declines rapidly after removal of the stress factor [22]. Despite widespread studies of alterations in cortisol levels

under different stress conditions, recent studies have indicated sAA activity as a marker of exercise-induced stress [8,39].

The goal of this study was to analyze the effect of an incremental effort test on the salivary protein profile and to determine whether any specific protein was altered in response to such stress. We also measured salivary alpha-amylase threshold (sAAT), PAT and BLT and searched for correlations among them.

## **METHODS**

### **Subjects**

Twelve national-contending Caucasian male cyclists participated in the study. The average ( $\pm$  SD) age, height and mass of the participants was  $22.62 \pm 3.51$  years,  $1.78 \pm 0.21$  m and  $71.80 \pm 5.76$  kg, respectively. Blood biochemical analyses had been previously carried out to obtain a baseline health status of the participants. None of the athletes was using pharmaceuticals, anabolic steroids or tobacco at the time of the study. The subjects, familiar with the laboratory conditions and testing procedures, were asked to limit their physical activity and abstain from stimulating (coffee, guarana, etc.) or dye-containing substances for 24 h before the test. Participants were asked to drink about two liters of water on the day preceding the test to avoid dehydration during the day of the test. They were also advised to have their last meal at least two hours before the test procedures. Participants signed a consent form to indicate their awareness of all procedures that would be carried out during and after the test. The experimental protocol began only after it was submitted to and approved by the Ethical Human Research Committee (decision no. 140/04) at the Federal University of Uberlandia, Brazil, and meets the ethical standards of the IJSM [15].

### **Procedures**

The tests were carried out on a cycle-ergometer (ERGO-FIT 167, Pirmasens, Germany) between 15:00 and 17:00 hours with room temperature maintained between 24 and 26°C. Participants engaged in stretching exercises and a brief 2-min warm-up on the cycle-ergometer with no load before the test started. Heart rate was measured continually with a cardiac monitor (Polar Electro Oy, Kempele, Finland). The test began with a 50 W load, which was increased 25 W every two minutes up to exhaustion. The pedal rotation frequency was kept between 68 and 75 rpm. Saliva was stimulated by chewing gum and collected by the spit method [23]. Participants were required to perform oral asepsis before the test procedures to avoid contamination of the samples with cellular debris and other materials. Subjects drank 400 mL of water immediately before the test and were not allowed to drink more water during the test. Saliva was collected immediately before the exercise (at rest), at the end of every stage, at which time the exercise load was

increased, and in the 5th and 15th minutes after voluntary exercise interruption (upon exhaustion). Saliva samples were placed in pre-cooled (4 °C) mini-tubes and kept on ice until centrifuged at 12,000 g (4 °C). Sediment was discarded and the supernatant frozen at -20 °C until the day of analysis. All analyses were carried out in duplicate. The supernatant was probed for TPWS content by the Coomassie Brilliant Blue-R 250 method [5] and sAA activity was measured by the kinetic method at 405 nm, using as substrate 2-chloro-p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotrioxide (CNP-G3) following the manufacturer's protocol (Amylase 405, liquid line, Wiener Lab, Argentina).

Unidimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out as previously described [20] using minigels with a 5–22% polyacrylamide gradient. The same amount of protein (3  $\mu$ g) was introduced into each lane of the gel. Identification of the sAA polypeptide was based on its migration within the gel in relation to polypeptides of known molecular mass (46-60 kDa), according to [29]. The sAA polypeptide was also visualized by western blot immunodetection. The relative intensity of sAA polypeptide in each stage of the progressive test was quantified by gel densitometric analysis using the Image Master VDS version 2.0 software, and the results were expressed as the integrated optical density (IOD).

For the immunodetection of sAA by western blotting, saliva samples were electrophoretically transferred to a nitrocellulose filter and probed with polyclonal antibody to human sAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) [34]. The immunoreactive polypeptide was revealed using the chromogenic NBT/BCIP assay. The broad range protein molecular weight standard consisted of a marker with nine clearly identifiable bands (Promega, Madison, USA).

Capillary blood (25  $\mu$ L) obtained from the earlobe was collected in mini-tubes containing 50  $\mu$ L of 1% NaCl, stored on ice for < 3 h, and frozen at -20 °C until analysis. Blood lactate (BL) was analyzed using an electro-enzymatic method (Lactate Analyzer YSI 1500 Sport, Yellow Springs, USA). A computerized automated method based on a bisegmented regression model was used to determine thresholds [16]. The model allowed us to identify thresholds of all variables examined in this study.

## **Statistical analysis**

Normality among BL, TPWS concentrations and sAA for each parameter were calculated by the Kolmogorov test. All data are expressed as the mean  $\pm$  SD. Statistical differences were determined using One-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. Correlation analysis was performed by Pearson's method. For all analyses,  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS

Physical exercise altered the 1D electrophoresis profile of salivary total protein mainly by increasing the concentration of the polypeptide corresponding to sAA (Figure 1a). This response was observed in all samples of saliva collected despite subject-to-subject variations present in salivary protein profiles. Immunoblots of total saliva probed with human anti-alpha-amylase identified a polypeptide E with a molecular mass of approximately 51 kDa corresponding to sAA (Figure 1b). The intensity of the stained protein band increased with each increment of exercise load, suggesting increased secretion of the polypeptide. The intensities of the sAA bands observed after each stage of the test were quantified by densitometric analysis (Figure 1c), revealing differences ( $p < 0.05$ ) between the intensity of alpha-amylase collected immediately before and during the last stage of exercise (exhaustion), as well as five and fifteen minutes after its conclusion.

We observed sAAT, PAT and BLT in 58%, 83% and 100% of our sample, respectively. Pearson's correlation indicates a strong and significant association among these variables during the incremental effort test (Figure 2). The average duration of the entire test was twenty-four minutes.

Analysis of TPWS and BL concentrations, as well as sAA activity, revealed that all these parameters increased from the resting state to the point of exhaustion and then decreased after the end of the effort test. A one-way ANOVA test revealed significant differences at the moment of exhaustion in relation to resting conditions, exhaustion in relation to post-exercise and post-exercise in relation to resting conditions for TPWS and BL concentrations ( $p < 0.01$ ) and for sAA activity ( $p < 0.05$ ). It should be noted that TPWS, BL and sAA values declined significantly 15 minutes after the end of the effort test (Figure 3).

## DISCUSSION

The salivary protein profile changed during the effort test, with a notable increase in the concentration of alpha amylase polypeptide. The PAT, sAAT and BLT were also determined and found to be correlated. After the end of the test, all biochemical parameters returned to resting levels within 15 minutes, except for blood lactate, which remained at an intermediate level between rest and exhaustion.

The electrophoretic profile of salivary proteins revealed a significant increase in the concentration of alpha-amylase during the incremental effort test. A possible mechanism for such an increase is the release of sAA stored in membrane-bound secretory granules via exercise-induced activation of the beta receptor [7], which can increase sympathetic activity and alter salivary gland secretion [30]. It is unlikely that an increase in *de novo* synthesis of alpha amylase could account for this boost in sAA levels as there would be insufficient time for biosynthesis and secretion of the enzyme.

Other authors have reported that increases in salivary protein concentration are associated with dehydration [38] and parasympathetic withdrawal leading to decreased salivary flow [14]. Our data from the electrophoretic profile, which was carried out using samples of similar protein concentrations instead of equivalent volumes, indicates that alterations in TPWS caused by exercise are directly related to alpha-amylase since other salivary proteins were not altered. A previous study showed the relative independence of sAA secretion from changes in saliva flow rate [26], thus eliminating the influence of dehydration, evaporative loss of salivary water and parasympathetic withdrawal in our results.

A possible biological role for this response is that, during exercise, sAA activity may provide a protective effect against infection, since this enzyme has been shown to inhibit bacterial attachment to oral surfaces [27]. This may be a compensatory response to the lowering of immunoglobulin A (IgA) after intense exercise as previously reported [11], although we did not observe alterations in the corresponding molecular weight band to IgA.

In agreement with our results, it has been suggested [4,6,10] that alpha-amylase in saliva strongly correlates with lactate threshold. We also observed a correlation between BLT and PAT. These changes in salivary total protein

concentration might have been elicited in response to sympathetic activation, and we speculate that they also affect blood lactate concentration, which may explain the correlation between salivary and lactate thresholds [21]. Previous work measured lactate in saliva [28] as an alternative to its measurement in blood [31], but one disadvantage of this technique is that oral mucosa is bacteria-rich, and once exposed to air, bacteria produce lactate because of the inactivation of pyruvate formate-lyase, which catalyzes the first step of pyruvate conversion to formate, acetate and ethanol [19]. Such a scenario could render this method inaccurate for determining exercise-induced lactate production.

Salivary alpha-amylase activity, salivary total protein and blood lactate concentrations increased considerably from the resting state to the last stage of exercise; they also declined significantly 15 minutes after the test was concluded. It is clear that physical exercise induces acute alterations in the concentrations of these biochemical parameters, which rapidly return to pre-test levels 15 minutes after conclusion of the test.



## **CONCLUSION**

Our findings suggest that BL, TPWS and sAA were altered due to exercise in a manner directly correlated to exercise load. The saliva as a potential source of exercise noninvasive biomarkers offers less of a biohazard to both donor and collector than blood. Increased expression of sAA polypeptide during the incremental effort test suggests that sAA is the main protein responsible for the increase in TPWS concentration. Due to its relative simplicity, monitoring TPWS is an efficient and simpler method than measuring sAA activity for determination of exercise intensity. Further research is needed to evaluate whether such salivary biomarkers would have a shift in their curve in chronic response to physical exercise.

## LEGENDS

**Figure 1 – Electrophoresis pattern of total saliva protein during incremental exercise, immunodetection and densitometric analysis of human salivary alpha-amylase.** (A) Digitized image of gel stained with Coomassie Blue-R 250 containing 3 µg of salivary total protein per lane, corresponding to each stage of the exercise in watts (Rest, 50, 75, etc.). P5 and P15 represent samples collected during the 5<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> minute post-exercise. Arrow indicates alpha amylase. MW indicates the protein standards used, and their respective relative molecular masses are indicated by the numbers to the left of the gel; (B) Immunoblotting of total saliva probed with anti-human salivary alpha-amylase (sAA) antibody; the strongest staining polypeptide in the gel electrophoresis as alpha-amylase; (C) Increase in the mean values and standard deviations (+/- SD) (n = 8) of the densitometric analysis of salivary alpha-amylase concentration, expressed in watts (W), in each stage of exercise and post-exercise (P5 and P15). (\*) indicates difference from rest ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2 - Correlation between salivary and lactate thresholds.** Relationship of the blood lactate (BLT), total salivary protein (PAT) and amylase (sAAT) thresholds expressed in watts. Upper and lower lines represent the confidence level (95%) for the values predicted by the regression equation (central line), while (r) represents the coefficient of linear correlation between the analyzed variables.

**Figure 3 – Exercise intensity markers before the test, during exhaustion and after the test.** Alterations in blood lactate (BL) concentrations, total protein concentration of whole saliva (TPWS) and salivary alpha-amylase (sAA) activity during rest, exhaustion and after the test. Plots display absolute values of the mean ( $\pm$  standard deviation) of blood lactate (BL) and salivary total protein (TPWS) concentrations as well as salivary alpha-amylase activity (sAA) at the moments of rest, exhaustion and 15 min after the last stage (post-exercise). (†) Indicates  $p < 0.05$  vs. exhaustion and rest. (‡) Indicates  $p < 0.05$  vs. 15' post-exercise and rest. (§) Indicates  $p < 0.05$  vs. exhaustion and post-exercise. SD = Standard Deviation and SE = Standard Error.

# FIGURES

## Figure 1

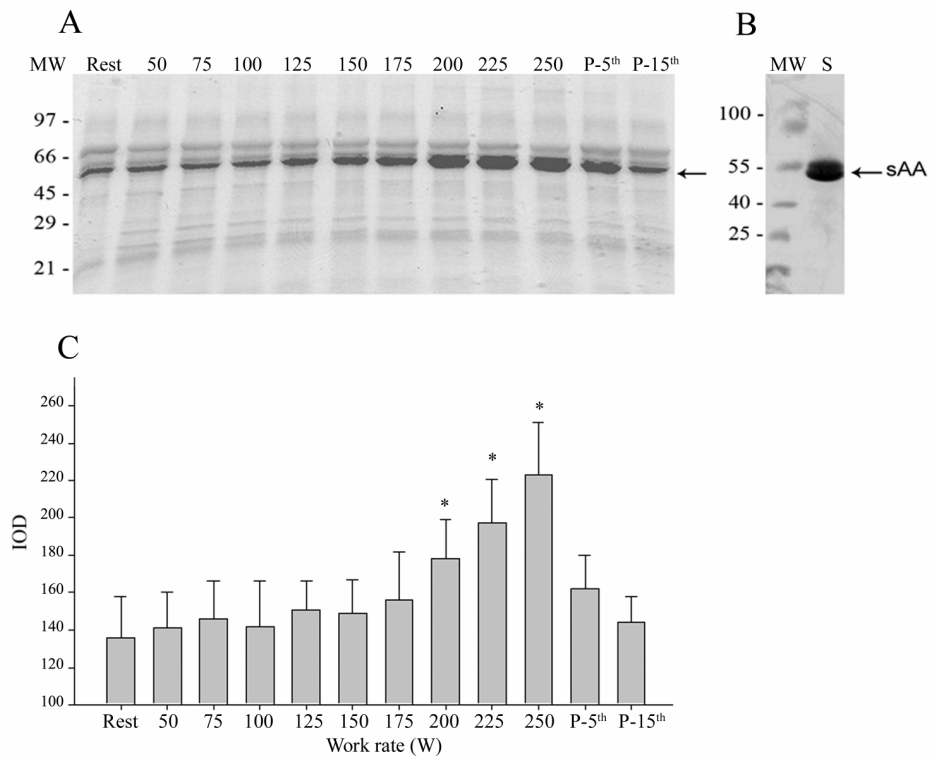
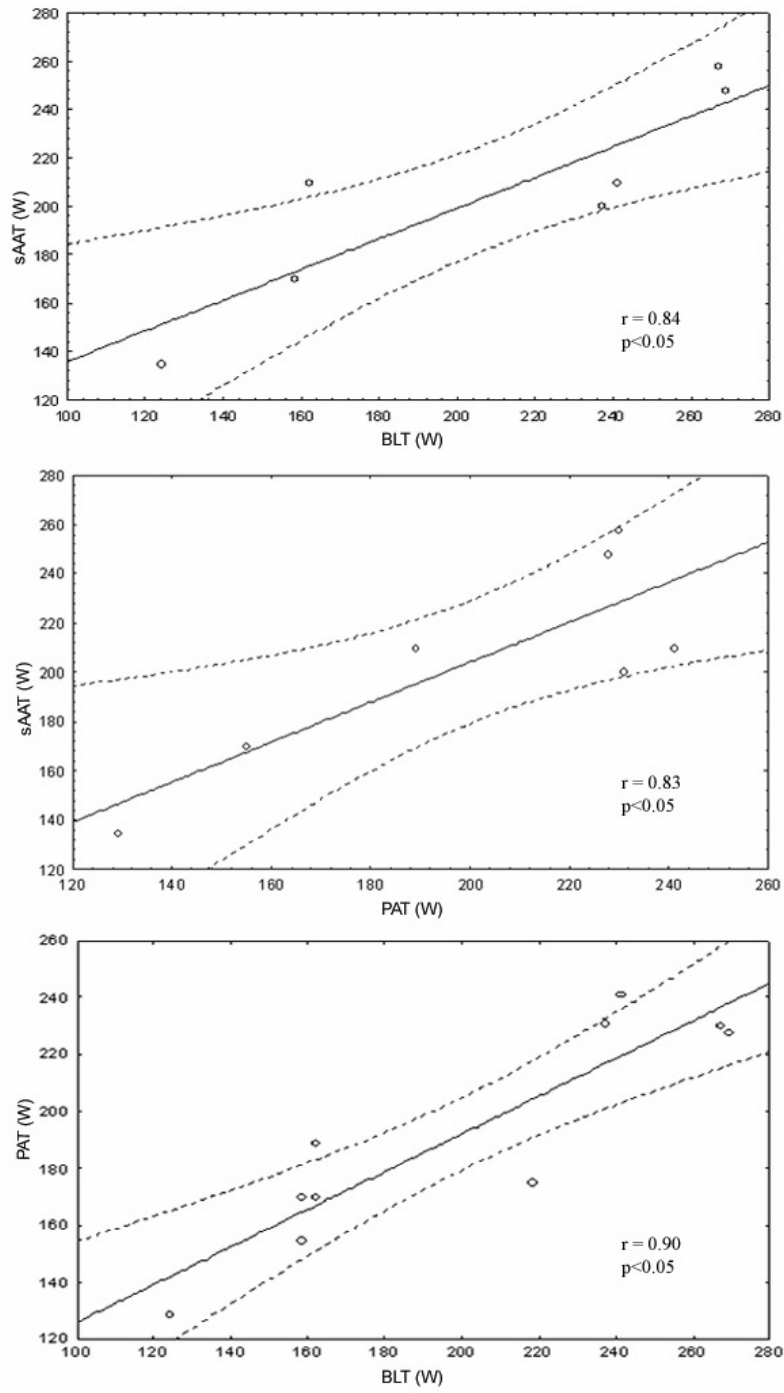
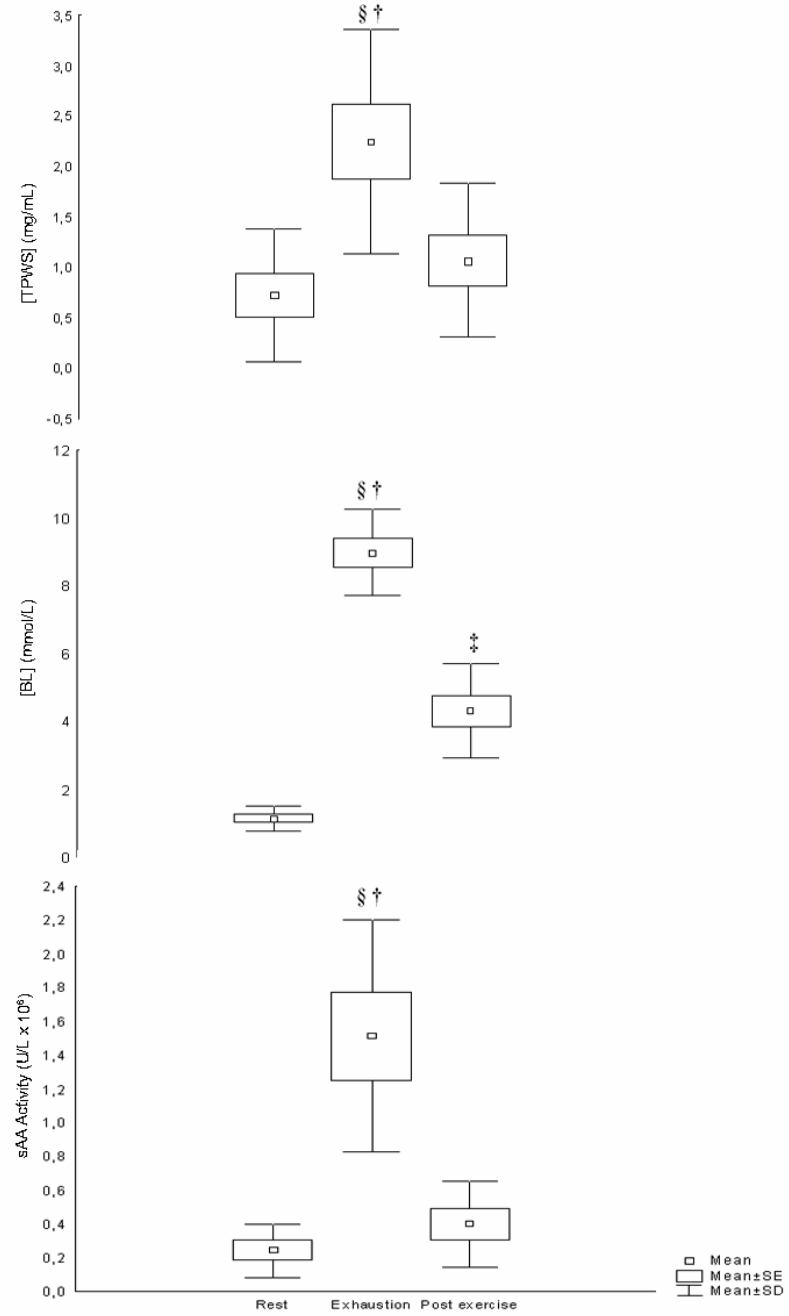


Figure 2



**Figure 3**



## REFERENCES

1. Asking B. Sympathetic stimulation of amylase secretion during a parasympathetic background activity in the rat parotid gland. *Acta Physiol Scand* 1985; 124: 535-542
2. Bautmans I, Njemini R, Vasseur S, Chabert H, Moens L, Demanet C, Mets T. Biochemical changes in response to intensive resistance exercise training in the elderly. *Gerontology* 2005; 51: 253-265
3. 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: 2046-2051
4. 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: 604-610
5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
6. Calvo F, Chicharro JL, Bandres F, Lucia A, Perez M, Alvarez J, Mojares LL, Vaquero AF, Legido JC . Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. *Can J Appl Physiol* 1997; 22: 553-561
7. Castle D, Castle A. Intracellular transport and secretion of salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 4-22
8. Chatterton RT, Jr., Vogelsong KM, Lu YC, Ellman AB, Hudgens GA. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol* 1996; 16: 433-448
9. Chicharro JL, Legido JC, Alvarez J, Serratos L, Bandres F, Gamella C. Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic threshold determination. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1994; 68: 214-218
10. Chicharro JL, Lucia A, Perez M, Vaquero AF, Urena R. Saliva composition and exercise. *Sports Med* 1998; 26: 17-27
11. Davison G, Allgrove J, Gleeson M. Salivary antimicrobial peptides (LL-37 and alpha-defensins HNP1-3), antimicrobial and IgA responses to prolonged exercise. *Eur J Appl Physiol* 2009; 106: 277-284
12. Gilman S, Thornton R, Miller D, Biersner R. Effects of exercise stress on parotid gland secretion. *Horm Metab Res* 1979; 11: 454

13. 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: 976-987
14. Hanna SJ, Brelen ME, Edwards AV. Effects of reducing submandibular blood flow on secretory responses to parasympathetic stimulation in anaesthetized cats. *Exp Physiol* 1999; 84: 677-687
15. Harriss DJ, Atkinson G. Ethical Standards in Sport and Exercise Science Research. *Int J Sports Med* 2009; 30: 701-702
16. Hinkley DV. Inference about the intersection in two-phase regression *Biometrika* 1969; 56: 495-504
17. Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA, Wong DT. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics* 2005; 5: 1714-1728
18. Impellizzeri FM, Rampinini E, Marcora SM. Physiological assessment of aerobic training in soccer. *J Sports Sci* 2005; 23: 583-592
19. Iwami Y, Takahashi-Abbe S, Takahashi N, Abbe K, Yamada T. Rate-limiting steps of glucose and sorbitol metabolism in *Streptococcus mutans* cells exposed to air. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 325-328
20. Laemmli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* 1973; 80: 575-599
21. Lehmann M, Schmid P, Keul J. Plasma catecholamine and blood lactate cumulation during incremental exhaustive exercise. *Int J Sports Med* 1985; 6: 78-81
22. Li TL, Gleeson M. The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling and circadian variation on saliva flow rate, immunoglobulin A and alpha-amylase responses. *J Sports Sci* 2004; 22: 1015-1024
23. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 694: 72-77
24. Nexø E, Hansen MR, Konradsen L. Human salivary epidermal growth factor, haptocorrin and amylase before and after prolonged exercise. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 269-273
25. 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: 1329-1335

26. Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF, Kirschbaum C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology* 2006; 43: 645-652
27. Scannapieco FA, Solomon L, Wadenya RO. Emergence in human dental plaque and host distribution of amylase-binding streptococci. *J Dent Res* 1994; 73: 1627-1635
28. Schabmueller CG, Loppow D, Piechotta G, Schutze B, Albers J, Hintsche R. Micromachined sensor for lactate monitoring in saliva. *Biosens Bioelectron* 2006; 21: 1770-1776
29. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 161-175
30. Schneider DA, McLellan TM, Gass GC. Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 608-613
31. Segura R, Javierre C, Ventura JL, Lizarraga MA, Campos B, Garrido E. A new approach to the assessment of anaerobic metabolism: measurement of lactate in saliva. *Br J Sports Med* 1996; 30: 305-309
32. Stainsby WN, Brooks GA. Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 1990; 18: 29-63
33. 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: 305-309
34. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354
35. van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf OT. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology* 2006; 31: 137-141
36. 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: 1313-1321
37. Walsh NP, Blannin AK, Clark AM, Cook L, Robson PJ, Gleeson M. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. *J Sports Sci* 1999; 17: 129-134



38. 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: 149-154
39. Yamaguchi M, Deguchi M, Miyazaki Y. The effects of exercise in forest and urban environments on sympathetic nervous activity of normal young adults. *J Int Med Res* 2006; 34: 152-159
40. Yamaguchi M, Kanemori T, Kanemaru M, Kanemaru M, Takai N, Mizuno Y, Yoshida H. Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. *Biosens Bioelectron* 2004; 20: 491-497

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)