



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Vinicius Rodrigues de Araujo

**Utilização de marcadores salivares para avaliação e controle do
desempenho físico e cognitivo em atletas de futebol**

Rio de Janeiro

2016

Vinicius Rodrigues de Araujo

Utilização de marcadores salivares para avaliação e controle do desempenho físico e cognitivo em atletas de futebol

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Casemiro Lopes

Coorientadora: Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A663 Araujo, Vinicius Rodrigues de.

Utilização de marcadores salivares para avaliação e controle do desempenho físico e cognitivo em atletas de futebol./ Vinicius Rodrigues de Araujo. – 2016
97 f.

Orientador: Gustavo Casimiro Lopes.
Coorientadora: Patrícia Cristina Lisbôa da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos - Teses. 2. Esportes – Aspectos fisiológicos - Teses. 3. Futebol - Teses. 4. Saliva - Teses. 5. Cognição – Teses. I. Lopes, Gustavo Casimiro. II. Silva, Patrícia Cristina Lisbôa da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 612.766.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Vinicius Rodrigues de Araujo

**Utilização de marcadores salivares para avaliação e controle do desempenho esportivo
em atletas de futebol**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 17 de março de 2016.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Casemiro Lopes
Instituto de Educação Física e Desportos - UERJ

Coorientadora: Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. ^a Dra. Josely Correa Koury
Instituto de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Leonardo Nogueira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todas as pessoas que me apoiaram e me incentivaram durante estes dois anos. Em especial aos meus pais e irmãos, Manoel, Maria, Leandro e Maria Luiza, minha namorada Lívia que sempre esteve ao meu lado independente das dificuldades, e a minha querida avó Luiza (em memória).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Prof. Gustavo Casimiro Lopes, por me dar esta oportunidade, acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência e ser um grande exemplo de profissional.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

A toda a equipe do Laboratório de Fisiopatologia do Exercício que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio.

Aos meus amigos de laboratório Fabiele, Bruno, Pedro, Gabriel e Dionizio que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram muito.

A toda a equipe do Laboratório de Fisiologia Endócrina, em especial a minha coorientadora Patrícia C. Lisboa e a Ellen Santos por me receberem tão bem, me ajudarem e participarem deste trabalho.

A Prof. Leila Maria Lopes e Dra. Raquel Gomes Siqueira do Laboratório de Micologia Celular e Proteômica pelo apoio e colaboração no estudo piloto.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental pelo convívio e aprendizado.

A ausência da evidência não significa evidência da ausência.
Carl Sagan

RESUMO

ARAÚJO, Vinicius Rodrigues de. *Utilização de marcadores salivares para avaliação e controle do desempenho físico e cognitivo em atletas de futebol*. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A elaboração de um programa de treinamento físico depende do controle de diferentes parâmetros bioquímicos, que se relacionam com fatores como a intensidade do exercício, imunidade e com o estado redox. Além disso, estudos recentes também começaram a apontar a relevância da função executiva como componente determinante para o alcance de um alto nível de desempenho esportivo. Por outro lado, poucos estudos foram realizados em atletas até o momento utilizando estes marcadores na saliva juntamente com os testes de função cognitiva. O objetivo desse trabalho foi estudar a capacidade discriminatória das análises bioquímicas realizadas em saliva para avaliação do desempenho físico e sua relação com a função cognitiva em atletas de futebol. Trinta e dois atletas foram submetidos ao Bangsbo Sprint Test (BST) para avaliação da capacidade física e 48 horas depois ao Teste de Stroop (TSt) e Torre de Hanoi (ToH) para avaliação da função executiva. Os níveis de lactato na saliva aumentaram quando comparados aos valores Pré-BST (6,9 vezes; $p < 0,05$). A proteína total salivar seguiu o mesmo padrão com aumento observado após o BST (+34%; $p < 0,05$). As concentrações de imunoglobulina-A salivar (IgA-s) não mostraram diferença significativa após o BST. Os níveis de GSH e TBARs na saliva não mostraram diferença significativa, enquanto que a concentração de ácido úrico diminuiu após o BST (-26%; $p < 0,05$). Interessantemente, a superóxido dismutase (SOD) salivar aumentou (3,6 vezes; $p < 0,05$), enquanto que os níveis de catalase (CAT) na saliva não alteraram significativamente. Não houve correlação de nenhum dos parâmetros analisados com o desempenho no TSt, entretanto atletas localizados no percentil superior (P90) de cortisol na saliva (11,2 ng/ mL à 32,7 ng/ mL) apresentaram tempos mais longos para a resolução do ToH. A eletroforese 2D mostrou que 215 *spots* só apareceram no momento Pré-BST, 63 *spots* aumentaram e 108 diminuíram a sua expressão após o BST. Concluindo, a saliva é sensível às modificações induzidas pelo BST. A manutenção dos níveis salivares de TBARs após o BST parece ocorrer em função da diminuição dos níveis de ácido úrico, componente este que possui uma expressiva ação antioxidante. Neste sentido, o aumento de SOD pós-exercício parece agir como uma segunda linha de defesa antioxidante contra a produção de ROS induzidas pelo BST. Além disso, os resultados dos testes de função executiva indicam que níveis elevados de cortisol salivar possuem um efeito deletério no tempo de resolução da ToH, que se refere à memória de trabalho, o planejamento e solução de problemas. No entanto o TSt, que envolve a atenção seletiva e a velocidade de processamento de informações parecem não ser afetados pelos níveis de cortisol em repouso. E finalmente, a eletroforese 2D mostrou que o BST induziu a expressão diferencial de proteínas, visto que não surgiram proteínas novas após o teste, e dezenas de proteínas foram *up*-reguladas e *down*-reguladas após o BST. Estes dados sugerem que após uma análise proteômica, estas proteínas possam ser candidatas a marcadores de desempenho físico e/ou cognitivo em futuros estudos.

Palavras-chave: Futebol. Desempenho esportivo. Cognição. Saliva.

ABSTRACT

ARAÚJO, Vinicius Rodrigues de. *Use of salivary markers for evaluation and control of physical and cognitive performance in soccer players*. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The development of a physical training program depends on the control of different biochemical parameters, which relates to factors such as the intensity of exercise, immunity and the redox state. In addition, recent studies have also begun to point out the relevance of executive function as a determinant component for achieving a high sports performance level. Moreover, few studies have been conducted in athletes until now using these markers in saliva along with cognitive function tests. The aim of this study was to evaluate the discriminatory capacity of biochemical analyzes in saliva for evaluation of physical and its relation with cognitive function in soccer players. Thirty-two athletes were submitted to Bangsbo Sprint Test (BST) for evaluation of physical capacity and 48 hours later the Stroop test (TSt) and Tower of Hanoi (ToH) to assess executive function. Lactate levels in saliva increased when compared to Pre-BST values (6.9-fold; $p < 0.05$). The total salivary protein followed the same pattern with increase observed after BST (+ 34%; $p < 0.05$). The concentrations of salivary immunoglobulin-A (sIgA) showed no significant difference after the BST. GSH and TBARs levels in the saliva showed no significant difference, while the uric acid concentration decreased after BST (-26%, $p < 0.05$). Interestingly, superoxide dismutase (SOD) increased salivary (3.6-fold; $p < 0.05$), while the levels of catalase (CAT) in saliva did not significantly change. There was no correlation of performance parameters analyzed with TSt, however athletes at higher percentile (P90) of salivary cortisol (11.2 ng/ mL to 32.7 ng/ ml) showed longer times of ToH resolution. The 2D electrophoresis showed that only 215 spots appeared in the Pre-BST point, 63 spots increased and 108 decreased their expression after the BST. In conclusion, the saliva is sensitive to changes induced by BST. The maintenance of salivary TBARs after BST seems to occur in response of uric acid decrement, which presents expressive antioxidant effects. In this sense the increased post-exercise SOD levels in saliva seems to act as a second-line antioxidant defense against BST-induced ROS production. Furthermore, the results of executive function tests indicate that elevated levels of salivary cortisol have a deleterious effect on the settling time of ToH regarding to the working memory, the planning and troubleshooting. However, TSt which involves selective attention and information processing speed does not seem to be affected by cortisol levels at rest. Finally, the 2D electrophoresis showed that the BST induced differential expression of proteins, since additional proteins were not detected after the test, and dozens of proteins were up-regulated and down-regulated after BST. These data suggest that after a proteomic analysis, these proteins may be candidates for physical performance and/ or cognitive markers in future studies.

Keywords: Soccer. Sports performance. Cognition. Saliva.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Glândula parótida e Glândula acessória.....	22
Figura 2 -	Glândula submandibular e sublingual.....	22
Figura 3 -	Transporte de substâncias do plasma para as glândulas salivares.....	24
Figura 4 -	Esquema do desenho experimental	29
Figura 5 -	Esquema do Bangsbo Sprint Teste.....	31
Figura 6 -	Ilustração do Teste de Stroop.....	32
Figura 7 -	Ilustração da Torre de Hanoi.....	33
Gráfico 1 -	Tempo dos sprints no Bangsbo Sprint Test (BST).....	44
Gráfico 2 -	Transferrina Salivar dos atletas submetidos ao BST.....	45
Gráfico 3 -	Indicadores de intensidade do exercício.....	45
Gráfico 4 -	Indicadores da imunidade da mucosa oral.....	46
Gráfico 5 -	Homeostase redox.....	47
Tabela 1 -	Número de acertos de acordo com o percentual da amostra.....	48
Tabela 2 -	Movimento e tempo de realização da tarefa com 4 disco.....	48
Gráfico 6 -	Níveis de cortisol salivar por percentil de tempo na ToH.....	49
Gráfico 7 -	Caracterização pela intensidade do exercício.....	50
Figura 8 -	Perfil (1D) de Proteínas Pré e Pós BST.....	50
Figura 9 -	Eletroforese 2D.....	51
Figura 10 -	Esquema de sinalização redox salivar em atletas de futebol induzidos pelo BST.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico (<i>Adrenocorticotropic hormone</i>)
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
BST	<i>Bangsbo Sprint Test</i>
CAT	Catalase
CETRAF	Centro de treinamento para atletas de futebol
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato
CSR	Capacidade de <i>sprints</i> repetidos
DHBS	Diclorohidroxibenzeno sulfonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EP	Erro padrão
FCG	Fluído crevicular gengival
GSH	Glutationa reduzida
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IAA	Iodoacetamida
IgA	Imunoglobulina A
IgA-s	Imunoglobulina A salivar
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMC	Índice de massa corporal
IPG	Gradiente de pH imobilizado (<i>Immobilized pH Gradients</i>)

ITRS	Infecções do trato respiratório superior
KPE	Fosfato de sódio com sal dissódio
LDH	Lactato desidrogenase
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio (<i>Sodium Hydroxide</i>)
P25	Percentil 25
P50	Percentil 50
P75	Percentil 75
P90	Percentil 90
P100	Percentil 100
PAGE	Poliacrilamida
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PSA	Persulfato de amônio
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Espécies reativas ao oxigênio (Reactive Oxygen Species)
SDS	Dodecil-sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SOD	Superóxido dismutase
TBARs	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TCA	Ácido tricloroacético (Trichloroacetic acid)
TEMED	Tetrametiletenodiamina
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>
ToH	Torre de Hanoi
Tris-HCL	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
TSt	Teste de Stroop
UV	Ultravioleta Visível
SH	Sulfidrina
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático

LISTA DE SÍMBOLOS

+	Mais
%	Porcentagem
m	Metros
s	Segundos
mL	Mililitro
±	Mais ou menos
h	Horas
min.	Minutos
am	Antes do meio dia
xg	Força centrífuga
°C	Graus Celsius
-	Menos
cm	Centímetros
x	Vezes
mg/ dL	Miligrama por decilitro
uL	Microlitro
M	Molar
nm	Nanometros
>	Maior
mmol/L	Milimol por litro
KU/L	Quilo unidades por litro
/	Divisão
g/dL	Gramas por decilitro
mM	Milimolar
g/L	Gramas por litro
<	Menor
ng/ mL	Nanograma por mililitro
ug/ mL	Micrograma por mililitro
rpm	Rotações por minuto
≥	Menor ou igual

U/ L	Unidades por litro
g/ mL	Gramas por mililitro
uL/ml	Microlitro por mililitro
U/ mg	Unidades por miligramas
uM	Micromolar
N	Normalidade
V	Volts
Vhs	Volts horas
uA	Microamperes
v/v	Volume por volume
p/v	Peso por volume
mg	Miligramas
mA/ gel	Miliamperes por gel

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	28
1.1	Geral	28
1.2	Específicos	28
2	MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1	Desenho experimental	29
2.2	Participantes	30
2.3	Procedimentos experimentais	30
2.4	Coleta de saliva	31
2.5	Bangsbo Sprint Test (BST)	31
2.6	Testes de Função Executiva	32
2.6.1	<u>Teste de Stroop (TSt)</u>	32
2.6.2	<u>Torre de Hanoi (ToH)</u>	33
2.7	Análises bioquímicas	33
2.7.1	<u>Contaminação por sangue</u>	33
2.7.2	<u>Lactato</u>	34
2.7.3	<u>Proteínas Totais</u>	35
2.7.4	<u>Cortisol</u>	35
2.7.5	<u>Imunoglobulina A salivar (IgA-s)</u>	36
2.7.6	<u>Ácido Úrico</u>	37
2.7.7	<u>Superóxido Dismutase (SOD)</u>	38
2.7.8	<u>Catalase (CAT)</u>	38
2.7.9	<u>Glutathiona Reduzida (GSH)</u>	39
2.7.10	<u>Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico</u>	39
2.8	Padronização da análise preliminar de proteômica	39
2.8.1	<u>Quantificação de Proteínas Totais</u>	39
2.8.2	<u>Eletroforese 1D em mini gel de poliacrilamida SDS-PAGE</u>	40
2.8.3	<u>Focalização isoeletrica</u>	41
2.8.4	<u>Equilíbrio das strips e eletroforese bidimensional (2D)</u>	42
2.9	Análise estatística	42

3	RESULTADOS	44
3.1	Parte I – Efeito do Teste Físico (Resposta Aguda)	44
3.1.1	<u>Bangsbo Sprint Test (BST)</u>	44
3.1.2	<u>Contaminação por sangue</u>	44
3.1.3	<u>Indicadores de Intensidade do Exercício</u>	45
3.1.4	<u>Indicador de Imunidade da Mucosa Oral</u>	46
3.1.5	<u>Indicadores de Estresse Oxidativo</u>	46
3.2	Parte II – Avaliação da Função Executiva	48
3.2.1	<u>Teste de Stroop (TSt) e Torre de Hanoi (ToH)</u>	48
3.2.2	<u>Avaliação dos marcadores salivares com os testes de função executiva..</u>	49
3.3	Parte III – Abordagem preliminar de proteômica	49
3.3.1	<u>Caracterização da amostra</u>	49
3.3.2	<u>Perfil de proteínas em eletroforese unidimensional (1D)</u>	50
3.3.3	<u>Perfil de proteínas em eletroforese bidimensional (2D)</u>	51
4	DISCUSSÃO	52
	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE - Formato final do 1º artigo científico submetido.....	75
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	96
	ANEXO B - Comprovação de submissão do 1º artigo científico.....	97

INTRODUÇÃO

O termo "esporte" pode ser definido como um sistema complexo de práticas corporais ordenadas, fundamentado na superação dos competidores ou de resultados e/ou marcas estabelecidas anteriormente pelo próprio praticante e que envolve atividades de competição regulamentadas por alguma instituição (BELART; RANCÉ, 1991). O esporte passa a ter uma maior sistematização, organização e as regras se tornam mais rigorosa no final do século XIX, onde a seriedade do jogo é intensificada. Com isso os métodos de treinamento ficaram mais rígidos, disciplinando seus praticantes através de uma exigência maior pela vitória, e com táticas e estratégias para conseguir o melhor desempenho. (ELIAS, 1992).

Para Bompa (2002) e Tubino (2003) o conceito de esporte é dividido em esporte de lazer e esporte de alto rendimento, competição. Onde o esporte de lazer tem como principal objetivo o bem estar dos seus praticantes, sem nenhum compromisso com regras, sendo o mais importante a participação. Já o esporte de alto rendimento busca constantemente o melhor desempenho atlético, e os aspectos técnicos, táticos, físicos, sociais e emocionais são determinantes do resultado.

Dentre os esportes de alto rendimento, temos o futebol com 38 milhões de atletas profissionais que jogam o desporto regularmente pelo mundo, e no Brasil esse número é de aproximadamente dois milhões de indivíduos (COUNT, 2007). As características do futebol, juntamente com as atividades funcionais necessárias, obviamente, colocam uma demanda significativa nas habilidades físicas, técnicas, táticas, mentais e psicológicas de cada atleta. E uma das razões que fazem o futebol ser tão popular em todo o mundo é que os jogadores não precisam ter uma capacidade extraordinária dentro de qualquer uma dessas áreas de desempenho, mas possuir um nível razoável em todas (MANNING; LEVY, 2006). No entanto, existem tendências para a formação e seleção mais sistemática que influenciam os perfis de jogadores que competem no mais alto nível. Tal como acontece com outras atividades, o futebol não é uma ciência, mas a ciência pode ajudar a melhorar o desempenho (MANNING; LEVY, 2006; STØLEN et al., 2005).

Especificidade do futebol e protocolos de testes físicos

O futebol é caracterizado como uma atividade esportiva intermitente, com constantes alterações de intensidade (COELHO et al., 2009; KRUSTRUP et al., 2006). Neste sentido, Bangsbo et al. (2006) destacam que os jogadores de futebol executam um trabalho

intermitente, onde os jogadores exercem ações de baixa intensidade por mais de 70% do jogo. Em contrapartida, realizam entre 150 a 220 ações de alta intensidade em um curto período de tempo, o que gera um grau elevado de exigência física dos atletas que precisa ser levado em consideração ao planejar estratégias de treinamento.

Sob uma ótica temporal, utiliza-se majoritariamente da via aeróbia de transferência de energia, uma vez que em mais de 70% do tempo de jogo os atletas efetuam esforços de baixa intensidade (BANGSBO; MOHR; KRUSTRUP, 2006). Os autores afirmam ainda que cerca de 10 a 13 quilômetros são percorridos em média por jogadores de linha durante uma partida, variando de acordo com a posição do jogador em campo, bem como o estilo individual de cada um. No entanto, a maior parte é percorrida através de caminhadas e corridas de baixa intensidade. Segundo Martin (2002), somente entre 8 a 18% da distância total é percorrida na maior velocidade individual. Apesar da aparente predominância do sistema aeróbio, sob uma ótica qualitativa, o sistema anaeróbio de transferência de energia toma proporções aumentadas em termos de relevância ao longo de uma partida de futebol. Para Wisloeff et al. (1998), seria inviável que os atletas efetuassem atividades de alta intensidade durante a maior parte de um jogo de futebol devido a duração de uma partida. Isso pode sugerir que jogadores e/ou equipes capazes de efetuar atividades em maior intensidade por mais tempo podem obter vantagens frente a seus adversários.

A hipótese acima é corroborada por Mohr, Krustrup e Bangsbo (2003), onde atletas profissionais de futebol considerados superiores efetuaram 28% mais corridas em alta intensidade e 58% mais sprints em comparação a atletas profissionais considerados inferiores. O estudo procurou ainda avaliar a capacidade de recuperação desses atletas, submetendo-os a um teste específico de característica intermitente, o primeiro grupo obteve uma recuperação 11% melhor em relação ao segundo. Edwards, Clark e Macfadyen (2003) colocam que atletas com limiar anaeróbio mais alto são capazes de percorrer maiores distâncias com uma intensidade maior durante as partidas, sem acúmulo excessivo de lactato.

A capacidade de produzir muitos sprints em alta velocidade é essencial para o desempenho no futebol. Têm sido demonstrado que as corridas em alta velocidade representam menos de 10% da distância percorrida em uma partida, e ainda assim são consideradas críticas para o resultado de um jogo (BANGSBO et al., 1991; EKBLUM, 1986; REILLY; THOMAS, 1976; WITHERS et al., 1982).

O termo "capacidade de sprints repetidos" (CSR) foi introduzido pela primeira vez por Fitzsimons et al. (1993) e refere-se à "capacidade de reproduzir regularmente os esforços de sprint máximo". Na tentativa de compreender o mecanismo fisiológico envolvido na CSR,

vários testes de campo foram desenvolvidos (BAKER; RAMSBOTTO; HAZELDINE, 1993; BANGSBO, 1994; DAWSON; FITZSIMONS; WARD, 1993; FITZSIMONS et al., 1993; TUMILTY et al., 1988; WADLEY; LE ROSSIGNOL, 1998). Todos estes protocolos têm formatos similares, sendo que as distâncias percorridas para cada sprints variam entre 20 e 40 metros (m). Por outro lado, o número de repetições fica entre 6 e 18, com intervalos de recuperação de 15 a 25 segundos (s).

Todos os estudos anteriores envolvendo protocolos CSR tentaram estabelecer a validade lógica do protocolo. Fitzsimons et al. (1993) e Wadley e Le Rossignol (1998) colocam que o teste de CSR desafia os sistemas de energia de forma que melhor representa a situação do jogo. Apenas um dos protocolos examinados usou recuperação ativa (BANGSBO, 1994). Além disso, a maioria dos protocolos CSR envolve uma execução unidirecional e tem negligenciado a natureza multidirecional de um esporte como o futebol. Apenas os protocolos de Baker et al. (1993) e Bangsbo (1994) incorporaram um componente multidirecional. Neste contexto, só o protocolo denominado Bangsbo Sprint Test (BST), proposto por Bangsbo (1994), incorpora um descanso ativo e o componente multidirecional, e demonstrando alta confiabilidade para ser utilizado como teste de campo específico para o futebol (BANGSBO, 1994; WRAGG, 2000).

Fatores associados ao treinamento de alto rendimento

Levando em consideração todas as habilidades anteriormente citadas para um bom desempenho esportivo, é fundamental o atleta ter um bem-estar físico, psíquico e social. Por outro lado, para aumentar a desempenho no alto rendimento, a estratégia mais utilizada é o treinamento rigoroso, onde é exigido uma preparação com grande demanda de esforço físico e psicológico. Nos grandes clubes o que se encontra é uma rotina de treinamento caracterizada por longos períodos de duração e carga elevada, isto gera uma pressão nos atletas e força-os a desenvolver níveis de adaptação excelentes em vista aos estímulos diferentes que o esporte de alto rendimento requer (BOMPA, 2002; BRANDÃO, 2000; GARRETT; KIRKENDALL, 2003; GOMES, 2009; LEHMANN et al., 1998; TUBINO, 2003).

O desequilíbrio entre a proporção de estímulo e resposta ocorre quando atletas de alto nível apresentam uma recuperação insuficiente e a rotina de treinamento excede as exigências psíquicas e físicas. Sendo assim, o esportista pode ser prejudicado com uma queda de desempenho, além de possíveis transtornos ligados ao excesso de treino e o surgimento de lesões (LEHMANN et al., 1998). Além da diminuição do desempenho, têm sido observados vários danos celulares quando os níveis de carga de treino ultrapassam a capacidade do

organismo de se adaptar, desencadeando consequências graves à carreira do atleta, desde um afastamento por pouco tempo até ao abandono precoce do esporte (COSTA; SAMULSKI, 2005; COUTTS; WALLACE; SLATTERY, 2007). Alguns atletas iniciantes e até mesmo os mais experientes, não suportam as demandas de treinamento e ficam próximos de desenvolver uma grave lesão musculoesquelética ou algum distúrbio psicológico (MANNRICH, 2007; SAMULSKI, 2009). Neste contexto o futebol é um esporte que exemplifica bem esta situação, dentro de um ambiente de cobranças e almejando uma carreira de sucesso, os jogadores se submetem às exigências de seus treinadores.

Brandão (2000) afirma que por tratar-se de um esporte bastante complexo, para compreender de forma completa o atleta de futebol de alto rendimento, existe a necessidade de uma perfeita interligação entre os aspectos psicológicos, táticos, técnicos e físicos ligados a esse contexto. Segundo Confederação Brasileira de Futebol (2008) o cronograma organizacional de uma equipe de futebol de alto rendimento é composto de atividades que requerem um planejamento sistematizado, estruturado conforme o nível competitivo que a equipe se encontra e do calendário das principais competições oficiais. Quanto à organização dos treinamentos, as atividades objetivam principalmente a adaptação dos atletas as exigências e aos desafios que as situações variadas de uma competição podem proporcionar.

Entretanto, devido à alta demanda de jogos, às pressões e cobranças, o atleta pode ficar comprometido e isso pode gerar um prejuízo no seu desempenho esportivo (BRANDÃO, 2000; COSTA; SAMULSKI, 2005; KELLMANN; KALLUS, 2001). Isto acontece, pois o esporte, no seu formato atual, visando a vitória “a qualquer custo” e, conseqüentemente, o máximo desempenho sempre, exige uma demanda psicológica e física estressante durante o período de preparação dos atletas.

Atualmente, percebe-se um considerável aumento nas cargas de treino, principalmente durante o período de preparação que precede uma competição. Vários treinadores quando percebem que seus atletas não apresentam um bom desempenho, utilizam da estratégia de aumentar a carga de trabalho. Além de não ser a atitude mais adequada, isso pode prejudicar e aumentar a vulnerabilidade e a susceptibilidade a doenças e, como consequência, uma queda no rendimento físico (COSTA; SAMULSKI, 2005; KELLMANN; KALLUS, 2001).

A recuperação, utilizada para superar os efeitos do estresse e da fadiga gerados pelo treinamento, tem sido tratada como um fator fundamental no alto rendimento esportivo (GRANELL; CERVERA, 2003). Ainda sim é importante ressaltar que, em longo prazo, essa carga de treinamento com alto volume e intensidade pode alterar cronicamente os valores

basais de determinados marcadores bioquímicos (CREWETHER et al., 2008; HANDZISKI et al., 2006).

Neste sentido, o desempenho global de um atleta de futebol se deve a diversos fatores. Basicamente tais condições parecem envolver não só aspectos físicos, mas também aspectos cognitivos (WARD; WILLIAMS, 2003). Além de habilidades físicas e de coordenação, o sucesso na esfera de desportos também depende de como as informações são processadas em função dos complexos contextos e em rápida mudança. Nas últimas duas décadas, uma ampla gama de capacidades de percepção-cognitiva têm sido estudadas no desporto (MEMMERT, 2011; VESTBERG et al., 2012).

Handziski et al. (2006) acompanhou jogadores de futebol profissional durante uma temporada e identificou que após o período de competição havia uma diminuição nas concentrações de ACTH e testosterona e um aumento do cortisol quando comparado ao período preparatório. Isto é de extrema relevância, pois, o cortisol desempenha um papel central na resposta fisiológica e comportamental a um desafio físico e/ou psicológico (GATTI; PALLO, 2011; HE et al., 2010). Alguns estudos mostraram que o estresse crônico induz déficits de memória (MCEWEN, 2004; MIZOGUCHI et al., 2000), paralelo com dano estrutural ao citoesqueleto e atrofia neuronal (SOUSA; ALMEIDA, 2002), e plasticidade sináptica prejudicada (KIM; DIAMOND, 2002; SOUZA; MAMIYA; ZOUAIN, 1998). Esse conjunto de fatores pode afetar a função cognitiva, que é o processo de aquisição do conhecimento por meio da atenção, memória, juízo, associação, imaginação, percepção, raciocínio, pensamento e linguagem (WAGNER et al., 2015; STAWSKI, 2011). De modo que, conseqüentemente, o funcionamento cognitivo de ordem superior, as chamadas funções executivas, também possa ser afetado (VERBURGH et al., 2014).

As funções executivas gerenciam outras funções cognitivas mais básicas (por exemplo, percepção visuo-espacial) e envolvem funções tais como a inibição do comportamento, atenção e memória de trabalho (ALVAREZ; EMORY, 2006; PENNINGTON; OZONOFF, 1996). As funções executivas podem ser importantes para um desempenho bem sucedido em vários esportes, porque facilita a adaptação a situações novas ou alteradas, atenção, bem como a escolha de estratégias de jogo (VERBURGH et al., 2014; WILLIAMS; ERICSSON, 2005). Vestberg (2012) sugere que um alto desempenho das funções executivas é importante para o futebol e pode até mesmo prever o sucesso futuro neste esporte, e avaliação dos componentes do funcionamento cognitivo de ordem superior pode ser realizada através de alguns instrumentos (CONTI et al., 2015; CZERMAINSKI; BOSA; DE SALLES, 2014). Uma destas ferramentas é o teste de Stroop, amplamente

utilizado para avaliar a atenção seletiva, controle inibitório e a atenção sustentada (BRUGNOLO et al., 2015; STROOP, 1935). Outro teste bastante simples de ser aplicado é a Torre de Hanoi, uma ferramenta neuropsicológica, muitas vezes usada para avaliar habilidades de planejamento (BALACHANDAR et al., 2015; BRENNAN; WELSH; FISHER, 1997; GOEL; PULLARA; GRAFMAN, 2001).

Neste contexto, é fato que para um bom desempenho no futebol é necessário um treinamento ideal de todas as dimensões: cognitivas, táticas, técnicas e físicas. E quando isto é realizado de forma planejada, apresenta um impacto favorável na saúde e desempenho. Entretanto, este equilíbrio muitas vezes se encontra fragilizado devido à relação entre os períodos de treinamento/competição com os intervalos de descanso, que quando são insuficientes podem levar a queda do desempenho físico, porém outros sinais e sintomas podem ser observados como fadiga, alterações neuroendócrinas, irritabilidade e baixa imunidade (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006; MEEUSEN et al., 2006; SMITH, 2000).

Neste sentido, a dosagem dos hormônios testosterona e cortisol, é comumente utilizada para avaliar este quadro, uma vez que em atletas submetidos a elevadas cargas de treinamento, podem ser observadas no plasma altas concentrações de cortisol e baixas concentrações de testosterona (BROWNLEE; MOORE; HACKNEY, 2005; FRY; KRAEMER; RAMSEY, 1998; HOOGEVEEN; ZONDERLAND, 1996; MASO et al., 2004).

Nesta mesma perspectiva de possíveis marcadores para avaliar respostas ao exercício/treinamento físico, o estudo pioneiro de Margonis et al. (2007) demonstrou que um programa de treinamento de alta intensidade realizado semanalmente, repetido por seis dias consecutivos, gerou um quadro de estresse oxidativo, compatível com o quadro de queda de rendimento. A partir daí começaram a surgir pesquisas considerando o estado redox como um importante fator para um adequado desempenho físico (LOMBARDI et al., 2010; TANSKANEN; ATALAY; UUSITALO, 2010).

Contudo, o fluído utilizado como amostra nestes estudos foi o sangue, pois até o momento é o mais popular e amplamente aceito para uso em diagnósticos clínicos e estudos experimentais. A análise dos componentes do sangue revelou associações com vários processos de doença; uma vez que este fluido circula em volta de tecidos e órgãos, e é potencialmente capaz de conter os subprodutos de áreas doentes, por exemplo, tumores (LOO et al., 2010).

Apesar da análise de sangue e seus componentes tem sido utilizada para procedimentos de diagnóstico de laboratório durante várias décadas e bastante utilizado para avaliação em Bioquímica do Exercício e do Esporte, os atletas apresentam resistência à coleta

de sangue por diversos fatores, como aicmofobia (medo de agulhas), crença de que a retirada de sangue promova queda de desempenho ou uso do mesmo para exame antidoping (LIPPI et al., 2009; PEÑAILILLO, 2015; MOREIRA et al., 2009). Como alguns autores destacam que outros fluidos biológicos são também frequentemente utilizados para avaliar o comportamento de doenças, por exemplo, urina, fluido cerebrospinal e a saliva (Mandel, 1990; Wong, 2008), que neste caso pode oferecer vantagens distintas em algumas situações.

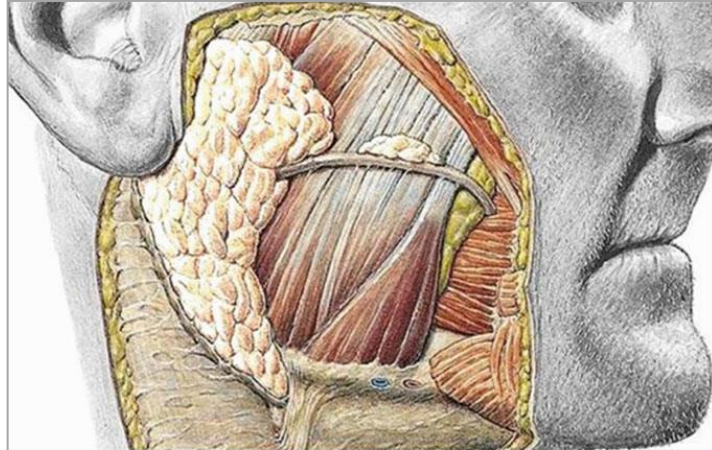
Saliva

A saliva é um líquido claro ligeiramente ácido (pH 6 à 7), secretado na boca, principalmente a partir das glândulas salivares (SPIELMANN; WONG, 2011). É um fluido hipotônico composto basicamente de água, eletrólitos e moléculas orgânicas (por exemplo, aminoácidos, proteínas e lipídeos). Em condições normais, os adultos humanos produzem entre 500 a 1500 mL de saliva por dia (NAVAZESH, 1993).

A saliva total é composta por uma mistura complexa de fluido oral, contendo também fluido crevicular ou gengival a partir do soro derivado do sulco gengival, células epiteliais descamadas, orais e microrganismos tais como vírus, fungos, bactérias e endotoxinas bacterianas. Em alguns casos, o sangue e o soro de feridas orais, expectoração brônquica e de secreções nasais, e detritos de comida também podem ser encontradas na saliva (KAUFMAN E LAMSTER, 2002; NEGRONI, 2000).

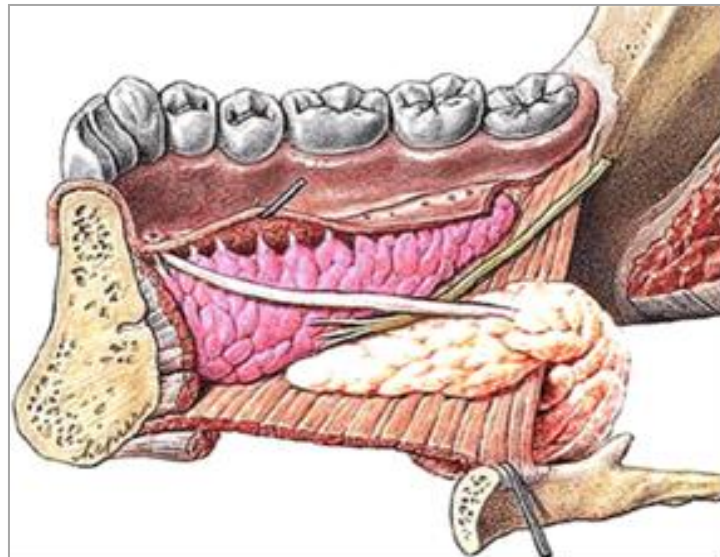
Presente na cavidade oral, este fluido origina principalmente de três glândulas salivares: parótida, submandibular e sublingual, que produzem 90% das secreções salivares, enquanto os 10% restantes são provenientes das glândulas menores (labial, bucal e palatal) (NAVAZESH; KUMAR, 2008). As glândulas parótidas, nos seres humanos, são inteiramente serosas uma vez que sua secreção carece de mucina (Figura 1), enquanto as glândulas submandibular e sublingual são mucosas e serosas (Figura 2).

Figura 1- Glândula parótida e Glândula acessória



Fonte: HANSEN; LAMBERT; OPPIDO, 2007

Figura 2- Glândula submandibular e sublingual



Nota: Observe os pequenos ductos da glândula sublingual.

Fonte: HANSEN; LAMBERT; OPPIDO, 2007

As glândulas salivares são estruturas tubuloalveolares que contêm ácinos e um sistema ramificado de tubos que conduzem para a cavidade oral, a partir da região do ácino. Esses tubos são referidos como ductos intercalares, estriados e excretores. Ambos, os ácinos e o ducto, participam da secreção salivar. A região acinar é o local de toda a geração de fluido e a parte que secreta mais proteína da glândula. Esta secreção primária é modificada durante a sua passagem posterior ao longo do ducto, onde ocorre considerável fluxo de eletrólito. (HAECKEL, 1996; HUMPHRE.; WILLIAMSON, 2001; NUNES; MACEDO, 2013; VERKMAN, 2000).

Componentes salivares

Apesar da diversidade da fonte de fluido, 99% do conteúdo da saliva é composta por água, enquanto que o restante 1% contém uma grande número de componentes inorgânicos e orgânicos (NAVAZESH; KUMAR, 2008).

Os componentes inorgânicos incluem eletrólitos como sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, e fosfato, que entram na saliva através de gradientes osmóticos e são regulados pela taxa de secreção, natureza do estímulo e do nível de mineralocorticóides na circulação, enquanto que os componentes orgânicos podem ser não-proteico ou proteico, derivados principalmente da síntese de proteínas e são armazenados como grânulos dentro das células acinares (CHIAPPIN et al., 2007; MALAMUD, 1992). Os componentes não-proteicos da saliva são o ácido úrico, bilirrubina, creatinina, glicose, lipídios (colesterol e ácidos graxos), aminas, lactato, entre outros (AAS et al., 2005).

As proteínas presentes na saliva são ricas em prolina, amilase, mucina, lisozima, IgA, lactoferrina, peroxidase, estatinas, estaterinas, metaloproteases de matriz, glicoproteínas e lipoproteínas, entre outros. Outros componentes protéicos incluem enzimas e inibidores de enzimas, citocinas, tais como interleucina-8, e hormônios, tais como catecolaminas, tiroxina, tri-iodotironina, cortisol, hormônio do crescimento, testosterona, progesterona, prolactina, e melatonina (NEGRONI, 2000; NIEUW AMERONGEN et al., 2007).

A saliva total pode também conter células epiteliais bucais, produtos da degradação do sistema imunitário do hospedeiro e endotoxinas (CHIAPPIN et al., 2007; NEGRONI, 2000; SPIELMANN; WONG, 2011). Esses componentes cumprem vários papéis, inclusive de resposta imune, proteção do tecido, atividade antimicrobiana, inibição de precipitação de cálcio, remineralização do esmalte, percepção de aroma, digestão, inibição da proteinase, bem como outras funções, tais como a transcrição, a proliferação de células, o sinal de transdução, quimiotaxia, e motilidade celular (SPIELMANN; WONG, 2011).

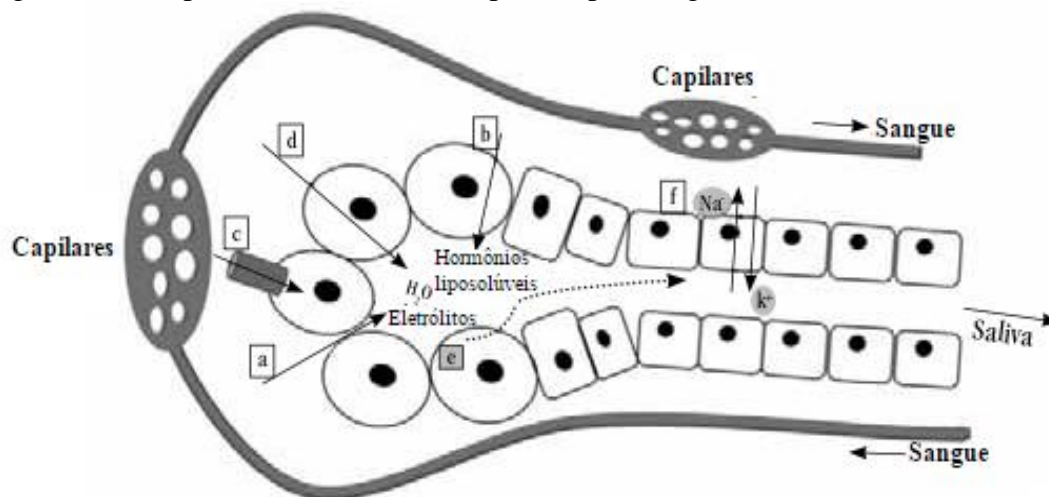
Além disso, a saliva auxilia em numerosas funções, como a fala, gustação e deglutição de alimentos, digestão oral, lubrificação de tecidos, ação antiviral, proteção antibacteriana, manutenção da integridade dentária e da homeostase oral (LOO et al., 2010; SPIELMANN; WONG, 2011).

Fisiologia da circulação plasmática/ salivar

A principal função da saliva é a manutenção da saúde oral, entretanto existe um fluxo do plasma para a saliva (HUMPREY, 2001; NUNES; MACEDO, 2013). Com isso, vários componentes são constituintes não-habituais da saliva e são derivados de diferentes órgãos e

sistemas. Algumas moléculas plasmáticas cruzam as barreiras capilares, o espaço intersticial, e as membranas das células acinares e dutais, atingindo o lúmen dos túbulos excretores das glândulas salivares. Assim, moléculas diferentes entram na saliva através de vias intracelulares e extracelulares (LLENA-PUY, 2006). O transporte seletivo através das membranas celulares é realizada por difusão passiva de moléculas lipofílicas (hormônios esteroide) ou transporte ativo através de canais proteicos (CHIAPPIN et al., 2007). Neste último caso, as moléculas com peso molecular <1900 Da (água, íons, hormônios) chegam por ultrafiltração através de junções celulares ou junções comunicantes presentes entre as células secretoras das unidades (PFAFFE et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3- Transporte de substâncias do plasma para as glândulas salivares



Legenda: (a) entrada de componentes por filtração simples. (b) entrada de compostos lipossolúveis por difusão passiva. (c) entrada de componentes por transporte ativo. (d) bombeamento ativo de íons de Na e concomitante entrada de H₂O. (e) componente produzido e secretado pelas glândulas salivares. (f) bombeamento de íons de Na para o sangue, produzindo fluido hipotônico.

Fonte: NUNES; MACEDO, 2013; adaptado de WONG, 2006.

Neste contexto, o fluido crevicular contém vários elementos plasmáticos, tais como, transferrina, IgG, IgM, neutrófilos, linfócitos T e B e macrófagos, entre outros, e algumas moléculas típicas de plasma, tais como albumina, são também encontradas na saliva devido a um mecanismo de transudação. Esta rota fornece os compostos do plasma com acesso à cavidade oral a partir do fluido crevicular ou diretamente a partir da mucosa bucal (CHIAPPIN et al., 2007; NEGRONI, 2000; SPIELMANN; WONG, 2011; YAN ET AL., 2009).

Como os componentes séricos de saliva são principalmente derivados da vasculatura local que se origina a partir das artérias carótidas (JOHNSON, 2001), a saliva tem uma fonte de fluido prodigiosa que fornece muitos, se não a maioria, das moléculas encontradas na

circulação sistêmica. Isso faz com que a saliva seja um fluido potencialmente útil para o diagnóstico de várias doenças sistêmicas, assim como para avaliar respostas crônicas e agudas ao exercício (CELECOVÁ et al., 2013; FABRE et al., 2012; KIRSCHBAUM, 1999; SAHEBJAMEE et al., 2008; SHIMADA et al., 2008).

Alguns estudos identificaram uma grande diversidade de biomoléculas na saliva que fornecem informações em relação a vários órgãos e sistemas, visto que elementos como bactérias, células epiteliais, eritrócitos, leucócitos podem estar presentes na saliva. Por outro lado, alguns destes compostos são sintetizados nas células das glândulas salivares, isto quer dizer que alguns componentes da saliva não estão relacionados com as concentrações plasmáticas, e sim com a resposta glandular local. (CHICHARRO, 1998; NUNES; MACEDO, 2013).

Tipos de saliva

A catalogação recente do proteoma salivar trouxe informações com grande potencial para aplicações diagnóstica e análise de comportamentos neste fluido (DENNY, 2008; HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007). A relevância clínica desta informação é pertinente para o tipo de saliva em análise, que pode ser específica de uma glândula ou saliva total. Existem três grandes glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) que introduzem a saliva na cavidade oral. A saliva a partir destas glândulas fornece diferentes misturas de fluido seroso e mucinoso, e é principalmente útil para a detecção de uma patologia específica da glândula. A saliva total, por outro lado, é composta por uma mistura de fluidos orais a partir das glândulas salivares maiores (submandibular 65%, parótida 23% e sublinguais 4%) e glândulas salivares menores (8%), e contém constituintes de origem não-salivar, incluindo fluido crevicular gengival (FCG), soro transudado para a mucosa e locais de inflamação, células epiteliais e do sistema imunológico, restos de alimentos e diversos micróbios (FOX, 1989; MANDEL, 1976).

A saliva total é mais estudada porque sua coleta é fácil, não invasiva e rápida de obter, sem a necessidade de equipamentos especializados. Também pode ser coletada com ou sem estimulação. Sendo a primeira comumente coletada pelo método “drenagem”, onde a cabeça da pessoa deve estar inclinada para a frente, de modo que a saliva se mova em direção a região anterior da boca e seja recolhida através de algum material auxiliar. Já a segunda é geralmente obtida por ação de mastigação (isto é, o indivíduo deve mascar parafina) ou por estimulação gustatória (isto é, utilização de ácido cítrico ou doces ácidos sobre a língua dos indivíduos) e é expectorada dentro de um tubo. O método estimulado é menos adequado para

aplicações diagnósticas e análise de comportamentos salivares, porque as substâncias utilizadas para estimular a saliva tendem a modular o pH do fluido e, geralmente, estimular a fase de secreção de água da saliva, resultando numa diluição de proteínas de interesse (OBERG; IZUTSU; TRUELOVE, 1982; RUDNEY, 1985).

Neste sentido, a identificação e análise de biomoléculas presentes na saliva podem fornecer informações sobre a função de vários órgãos do corpo (GREABU ET AL., 2009; OPPENHEIM et al., 2007; TIWARI, 2011; ZIMMERMANN et al., 2007). Dados discriminatórios de DNA, RNA, proteínas, metabólitos, microrganismos, e outros, podem ser candidatos a potenciais biomarcadores, com os quais é possível detectar alterações fisiológicas antes de sintomas clínicos se tornarem aparentes (LOO et al., 2010).

Justificativa

Recentemente a saliva se tornou um fluido potencial para avaliação de biomarcadores no diagnóstico e acompanhamento de doenças. O uso da saliva possui várias vantagens sobre as amostras de sangue, incluindo a natureza não invasiva da coleta com a consequente redução dos níveis de ansiedade e estresse (SHAH et al., 2011). Isto é particularmente importante em pediatria e geriatria, ou em pacientes com problemas vasculares (MALAMUD, 2011), bem como para avaliação de atletas. A simplicidade da coleta, tratamento, armazenamento e processamento reduzindo os custos associados (TIWARI, 2011), bem como o baixo risco de exposição dos técnicos de laboratório com amostras perigosas (LIMA et al., 2010; MILLER, 1994) tornam este fluido uma ferramenta de análise muito interessante.

A saliva fornece dados clinicamente relevantes e informações relativas a compostos celulares biologicamente ativos que podem ser usados para avaliar e monitorar o processo saúde-doença (TIWARI, 2011; ZIMMERMANN et al., 2007), bem como as respostas agudas e crônicas ao exercício (NUNES; MACEDO, 2013; CHICHARRO et al., 1998). Existe ainda o fato de que alguns atletas se recusam a realizar a coleta de sangue. Sendo assim, a saliva propicia avaliação dos voluntários em diferentes condições, inclusive podendo ser coletada pelo próprio indivíduo.

Apesar de diversos estudos utilizarem a saliva para avaliar diferentes respostas ao exercício, poucos são aqueles que estudaram os aspectos físicos e cognitivos no esporte. Neste contexto, nenhum estudo demonstrou até o momento os efeitos do exercício sobre os marcadores de estresse oxidativo em conjunto com os de intensidade do exercício e imunidade da mucosa oral. Sendo assim, acreditamos que tais parâmetros na saliva possam

ser utilizados como uma relevante ferramenta para avaliar o desempenho físico e cognitivo em atletas de futebol.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

O objetivo desse trabalho foi estudar a capacidade discriminatória das análises bioquímicas realizadas em saliva para avaliação do desempenho físico e cognitivo em atletas de futebol.

1.2 Específicos

a) Identificar o estado físico dos atletas utilizando análises realizadas na saliva, um material biológico obtido de forma não invasivo e de fácil acesso;

b) Investigar o potencial diagnóstico da saliva para a avaliação da função executiva em atletas de futebol;

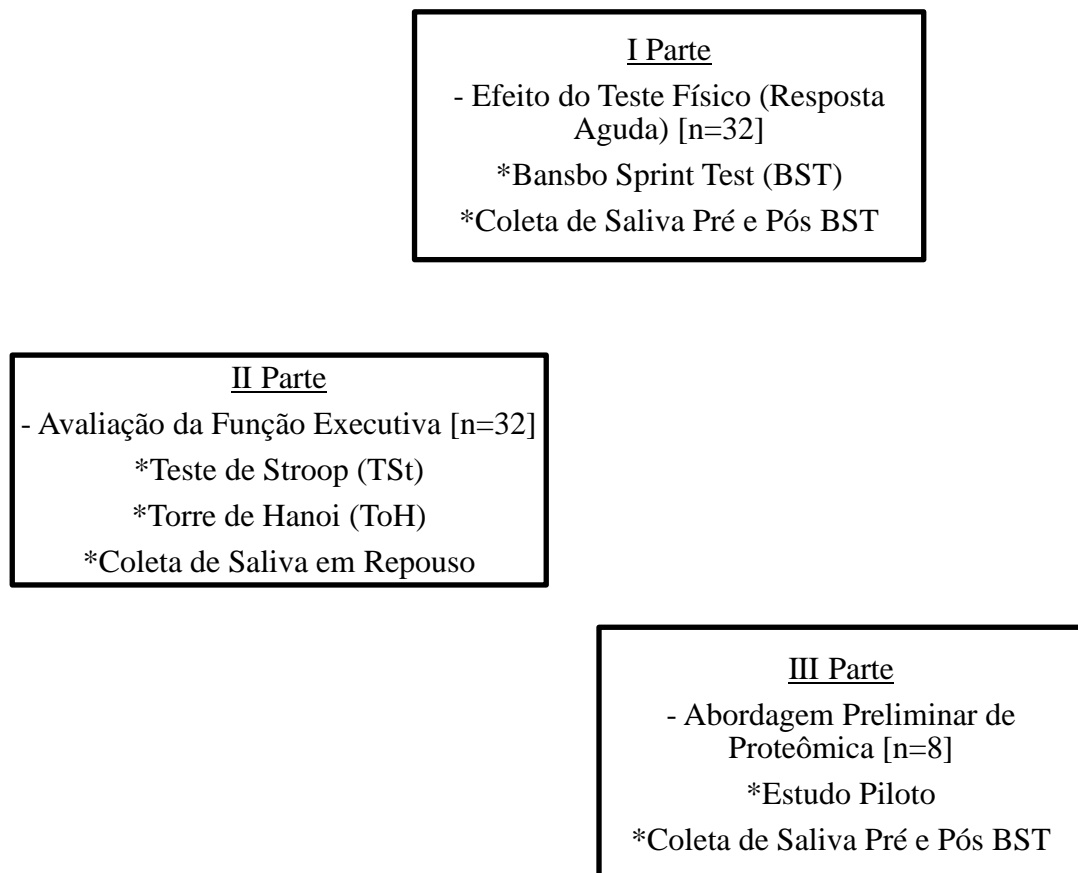
c) Avaliar o uso de marcadores hormonais salivares, de intensidade do exercício, imunidade da mucosa oral e estresse oxidativo como fatores relevantes no desempenho esportivo dos atletas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental

O presente estudo foi dividido em três partes. Na primeira parte, foi analisada a resposta aguda de determinados marcadores bioquímicos ao teste de capacidade de sprints repetidos em atletas de futebol, o Bangsbo Sprint Test (BST). Na segunda parte foi avaliada a função executiva dos jogadores de futebol profissional a partir de alguns testes específicos, teste de Stroop (TSt) e torre de Hanoi (ToH). E na terceira e última parte foram utilizadas as amostras de oito atletas, cuja intensidade do exercício (verificada a partir do lactato) foi semelhante, para um estudo piloto a partir de uma abordagem preliminar de proteômica (Figura 4).

Figura 4 - Esquema do desenho experimental



2.2 Participantes

Trinta e dois atletas de futebol (idade $21,2 \pm 4,2$ anos, altura $1,77 \pm 0,07$ m; de massa corporal $74,8 \pm 10,1$ kg; IMC $23,8 \pm 2,9$ Kg / m²) participaram do estudo. Todos os voluntários faziam parte de um centro de treinamento físico para jogadores de futebol, CETRAF (Rio de Janeiro, Brasil).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (ID: 30711414.8.0000.5259). O termo de consentimento livre esclarecido foi assinado por todos os participantes antes do teste. Foram excluídos do estudo os participantes que apresentaram um ou mais dos seguintes critérios: tabagismo, doenças crônicas, utilização de fármacos ou suplementos alimentares que pudessem interferir no seu desempenho e/ou resposta ao teste.

2.3 Procedimentos experimentais

O BST e os testes de função executiva (TSt e ToH) foram realizados em dias diferentes, com 48 horas (h) de diferença entre um e o outro. Os participantes foram instruídos a não comer e beber, exceto água mineral (sem gás), e abster-se de álcool, cafeína e exercícios extenuantes 2h antes dos testes. Todos avaliados chegaram às 8h e 30 minutos (min.) ao Centro de Treinamento de Futebol (CETRAF) e ficaram calmamente sentados durante 5 min. antes de fornecer amostras de saliva que representam as condições de repouso. A saliva foi obtida imediatamente antes dos testes (BST, TSt e ToH) e após a conclusão do BST.

Os participantes ingeriram 300 mL de água 1 min. antes de fornecer as amostras de saliva. Todas as amostras foram coletadas no período da manhã (9h às 12h am) e garantiu-se que nenhuma comida ou bebida fosse consumida 10 min. antes de cada coleta de saliva.

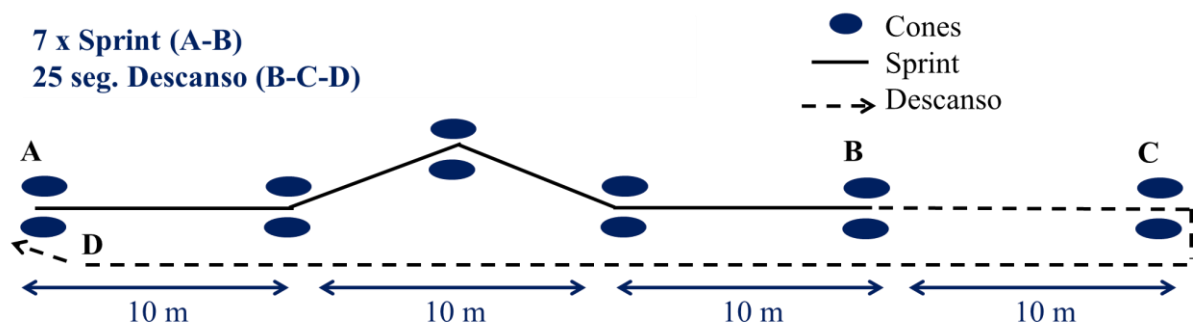
2.4 Coleta de saliva

A amostra foi coletada através de um modelo adaptado sem estimulação, onde um rolete de algodão (MasterRoll Plus - Wilcos®) ficou 3 min. na boca do atleta, e durante este tempo o indivíduo foi orientado a deixar o algodão sob a língua. Após esse tempo o rolete de algodão foi transferido para uma seringa hipodérmica, sem agulha, estéril, de 5 ml (BD Plastipak®), e desta seringa foi extraído a amostra que estava contida no rolete de algodão para um microtubo tipo eppendorf graduado de 2,0 mL de tampa lisa, e estes tubos foram armazenados em gelo temporariamente. Os eppendorfs com as amostras de saliva foram centrifugados a 3000xg por 10 min. a 4°C para remoção dos restos celulares, e o sobrenadante resultante foi armazenado à -20 °C para análises posteriores.

2.5 Bangsbo Sprint Test (BST)

Neste protocolo de teste de capacidade de sprints repetidos, os jogadores realizaram 7 sprints sucessivos com mudanças de direção, em uma distância total de 40m. Cada sprint foi separado por 25s de descanso ativo e para aumentar a confiabilidade do teste, os tempos dos sprints foram registrados com células fotoelétricas (Hidrofit®, Belo Horizonte- MG, Brasil) (Figura 5). As tentativas falhas durante o BST devido à queda ou escorregões foram excluídas e quando observado na primeira tentativa o teste foi interrompido com posterior reinicialização, após a recuperação total do atleta.

Figura 5- Esquema do Bangsbo Sprint Teste



2.6 Testes de Função Executiva

2.6.1 Teste de Stroop (TSt)

Foi utilizada uma versão computadorizada adaptada do teste Stroop tal como descrito por Ryu e Kim (2015). Este teste inclui dois tipos de ensaios: congruente (por exemplo, a palavra azul apresentada na cor azul) e incongruente (por exemplo, a palavra azul apresentada na cor vermelha). Para cada palavra, os participantes tinham que identificar a cor dos estímulos visuais dentro do tempo de 2s. O teste teve um tempo total de 1 min. e 30s. Para a execução da tarefa foi posicionado um monitor colorido de 17 polegadas ao nível dos olhos dos participantes, a uma distância aproximada de 80 cm. Durante o teste, as palavras verde, azul, preto e vermelho foram apresentadas congruentes ou incongruentes a sua cor, de forma aleatória, individualmente, no centro do monitor. A cada 2s era trocada a palavra na tela, e a partir disso foi contabilizado o número de acertos e erros ao final da tarefa, de acordo com um gabarito pré-estabelecido (Figura 6).

Figura 6 - Ilustração do Teste de Stroop

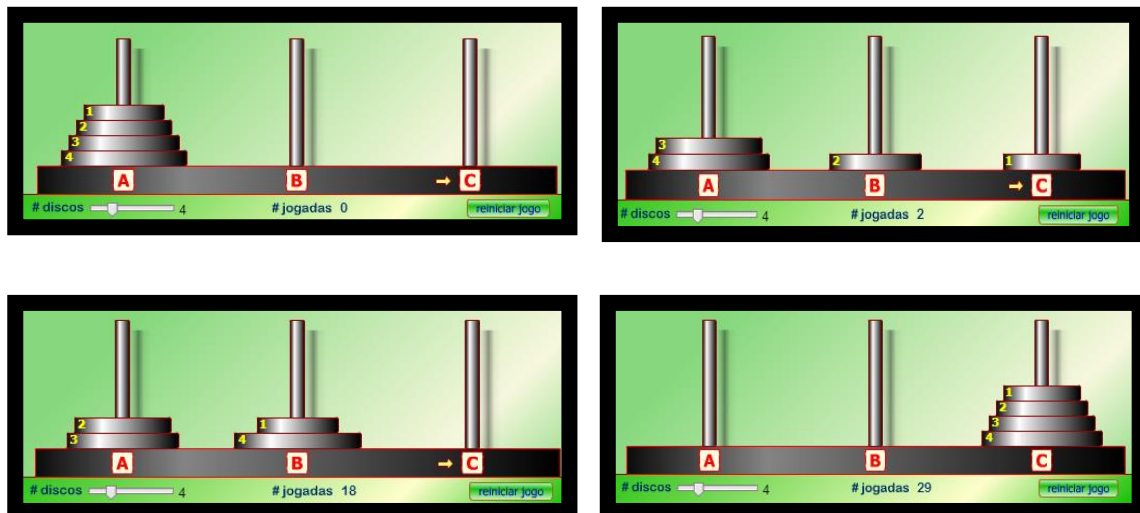
<u>Tela 1</u> Azul	<u>Tela 2</u> Verde	<u>Tela 3</u> Azul	<u>Tela 4</u> Preto
<u>Tela 5</u> Verde	<u>Tela 6</u> Vermelho	<u>Tela 7</u> Vermelho	<u>Tela 8</u> Verde

2.6.2 Torre de Hanoi (ToH)

A tarefa ToH envolve o deslocamento de todos os discos (discos de 2-5) a partir da sua primeira posição para uma posição final com um número mínimo de movimentos, sem violar as regras determinadas. Estas regras incluem: (a) um único disco deve ser movido de cada vez; (b) os discos devem ser deslocado apenas para os locais determinados; e (c) um disco maior não pode ser colocado sobre um disco menor (BALACHANDAR et al., 2015).

Com base em Goel et al. (2001), foi utilizado o jogo *Torre de Hanoi* com 4 discos disponibilizado on-line Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (<http://www.ufrgs.br/psicoeduc/hanoi/>), 2005, com licença GPL de software livre (Figura 7).

Figura 7- Ilustração da Torre de Hanoi



2.7 Análises bioquímicas

2.7.1 Contaminação por sangue

Este ensaio foi realizado por meio de kit comercial (Salimetrics™, Palo Alto, EUA), com método de imunoenensaio competitivo. Antes da utilização, todos os reagentes e a microplaca foram mantidos à temperatura ambiente. O tampão de lavagem foi preparado

através da diluição de um tampão concentrado [10x] (tampão fosfato, detergente e conservante) com água destilada (100 mL de tampão de lavagem concentrado (10x) para 900 mL de H₂O destilada).

A preparação das diluições em série do padrão de contaminação por sangue (tampão fosfato, indicador de pH e conservante) foi realizado de modo que as concentrações finais dos padrões foram, respectivamente, de 6,6 mg/ dL, 2,2 mg/ dL, 0,73 mg/ dL, 0,24 mg/ dL, e 0,08 mg/ dL.

Foram adicionados 20 uL dos padrões, controles (transferrina, tampão e conservante) e amostras de saliva nos poços apropriados, seguido de 20 uL do diluente de ensaio de contaminação por sangue em 2 poços para servir como o zero. Foi adicionado 50 uL da solução do conjugado diluído (20 uL do conjugado de enzima [transferrina conjugada com peroxidase de rábano silvestre e conservante] para o tubo de 8 mL do diluente de ensaio de contaminação por sangue) a cada poço. Em seguida foi adicionado 50 uL de anti-soro de contaminação por sangue (solução de anticorpo de coelho anti-transferrina humana) em todos os poços. A placa foi agitada durante 5 min. e incubada à temperatura ambiente durante 45 min. Após a incubação os poços foram lavados 4 vezes com 300 uL de tampão de lavagem, , em seguida, eliminando o líquido por decantação. No passo seguinte foi adicionado 100 uL de solução de substrato TMB a cada poço, e a placa foi agitada durante 5 min. e incubada no escuro (coberta) à temperatura ambiente durante um período adicional de 10 min. Logo após foi adicionado 100 uL de solução de parada (ácido sulfúrico, 2M), e a placa foi agitada durante 3 min. A absorbância foi determinada a 450 nm dentro de 10 min. As concentrações dos controles e das amostras de saliva foram determinadas por interpolação, e os valores foram expressos em mg/dL. O limite de sensibilidade foi de 0,08 mg/dL, e coeficientes médios intra e inter-ensaio de variação foram menos de 10% e 15%, respectivamente.

2.7.2 Lactato

Este ensaio foi realizado por meio de kit comercial (BioclinTM; Minas Gerais, Brasil), com o método ultravioleta visível (UV) enzimático utilizando a enzima lactato desidrogenase. Inicialmente foi formado um monorreagente com 20 mL do reagente enzimático (Tampão Borato [pH 10,0], LDH > 24 KU/L e Azida Sódica 15,38 mmol/L) adicionados a 5 mL do reagente de coenzima (NAD > 4 mmol/L, Tampão Citrato 200 mmol/L [pH 3,0] e Azida

Sódica 15,38 mmol/L.). Em seguida, foram adicionados em tubos diferentes 10 uL da amostra, 10 uL do reagente padrão (Lactato 10 mg/dL e Azida Sódica 15,38 mmol/L.) e 10 uL de água destilada (branco), e a cada tubo foi acrescentado 1,0 mL do monorreagente formado anteriormente. Todos os tubos foram homogeneizados suavemente, e incubados por 5 min. a 37°C. A absorbância da amostra foi determinada a 340 nm, e a leitura foi realizada em, no máximo, 30 min. A concentração foi determinada a partir do seguinte cálculo: $((\text{Abs. da Amostra} \times \text{Concentração do Padrão}) / \text{Abs. Padrão})$, e o resultado foi expresso em mg/ dL.

2.7.3 Proteínas totais

Foi realizado por meio de kit comercial (BioclinTM; Minas Gerais, Brasil), com método do Biureto (GORNALL, 1949). Foram adicionados em tubos diferentes 50 uL da amostra, 50 ul do reagente padrão (Albumina 4g/dL, estabilizador e Azida Sódica 15,38 mmol/L.) e 50 ul de água destilada (branco), e a cada tubo foi acrescentado 2,5 mL de Biureto.

Todos os tubos foram homogeneizados suavemente, e permaneceram em repouso durante 10 min. A Abs da amostra foi determinada em 545 nm, acertando o zero com branco, e a leitura foi realizada em, no máximo, 30 min. A concentração foi determinada a partir deste cálculo: $((\text{Abs. da Amostra} / \text{Abs. Padrão}) \times 4)$, e o resultado foi expresso em g/ dL.

2.7.4 Cortisol

Este ensaio foi realizado por meio de kit comercial (DiametraTM, Foligno, Itália), com um método colorimétrico imunoenzimático competitivo. Inicialmente foi feita a preparação dos calibradores, do conjugado diluído e da solução de lavagem. Antes da utilização, os calibradores ficaram em um mixer rotativo por pelo menos 5 min. Os calibradores prontos para apresentam 6 diferentes concentrações de cortisol: 0, 0,5, 1, 5, 10, 20 e 100 ng/mL. O conjugado diluído foi preparado imediatamente antes da utilização, adicionando 10 uL de conjugado (cortisol conjugado com peroxidase de rábano silvestre) a 1 mL de Tampão de Incubação (tampão de fosfato 50 mM [pH 7,4] e BSA 1 g/ L). E a solução de lavagem foi

preparada, antes da utilização, a partir da diluição de 50 mL da "Solução 10x Concentrada" (0,2M tampão de fosfato, Proclin <0,0015%) com água destilada, para um volume final de 500 mL. Antes do início do ensaio todos os reagentes atingiram a temperatura ambiente (22 à 28 °C).

Foram adicionados em diferentes poços da microplaca revestida com anticorpo anti-cortisol: 25 uL da amostra, 25 uL dos calibradores e 25 uL de água destilada (branco), e a cada poço foi acrescentado 200 uL de conjugado diluído. A placa foi incubada a 37°C durante 1h. O conteúdo de cada poço foi removido e lavados 3 vezes com 300 uL da solução de lavagem diluída. Durante cada etapa da lavagem, a placa foi suavemente agitada durante 5s e o excesso foi removido invertendo a placa sobre um papel absorvente. Em seguida foi adicionado a cada poço 100 uL de substrato de TMB (H_2O_2 - TMB 0,26 g/ L) e a placa foi incubada à temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) durante 15 min. no escuro. Após a incubação adicionou-se a solução de parada (H_2SO_4 0,15M) e a microplaca foi agitada suavemente.

A absorbância da amostra foi determinada em 450 nm dentro de 5 min. Os valores das amostras na curva de calibração foram interpolados para obter os valores correspondentes das concentrações, expressas em ng/ mL.

2.7.5 Imunoglobulina A salivar (IgA-s)

Este ensaio foi realizado por meio de kit comercial (SalimetricsTM, Paio Alto, EUA), com método de imunensaio competitivo. Inicialmente foi feita a preparação do tampão de lavagem, do IgA-s diluído, da solução de parada, da diluição em série do padrão de IgA-s e das amostras. Para o tampão de lavagem foi diluído 100 mL de uma solução de lavagem (tampão fosfato, detergente e conservantes) concentrada (10x) em 900 mL de água destilada. O IgA-s diluído foi formado a partir de 50 mL do diluente IgA-s (tampão fosfato e conservantes) concentrado (5x) em 200 mL de água destilada. A solução de parada liofilizada fornecida pelo kit foi reconstituída com 10 mL de água destilada. E após a diluição seriada do padrão de IgA-s as concentrações finais de padrões foram de 600 ug / mL, 200 ug / mL, 66,7 ug / mL, 22,2 ug / mL, 7,4 ug / mL e 2,5 ug / mL.

Em diferentes tubos, as amostras foram diluídas (1:5), 25 uL de saliva em 100 uL de IgA-s diluído. Para 10uL dos padrões preparados a partir da diluição seriada e 10 uL IgA-s

diluído, em tubos distintos, foi adicionado 4 mL de IgA-s diluído, que serviram como padrão e branco, respectivamente. O conjugado anticorpo-enzima (anticorpo de cabra anti-IgA humana conjugado com peroxidase de rábano e tampão) foi diluído (1:120) por adição de 25 uL do conjugado em 3 mL IgA-s diluído. E em seguida, 50 uL do conjugado anticorpo-enzima diluída foram adicionados a todos os tubos, suavemente misturados por inversão, e incubados durante 90 min. à temperatura ambiente. Após a incubação, o conteúdo dos tubos foram transferidos para placa de ensaio, misturando cada tubo novamente por inversão suave e adicionando 50 uL de cada tubo para a microplaca. A placa foi incubada a temperatura ambiente com agitação contínua a 400 rpm durante 90 min. Após este período a placa foi lavada 6 vezes, adicionando 300 uL do tampão de lavagem em cada poço e em seguida descartando o líquido. Depois foi adicionado 50 uL de solução de TMB, a placa ficou em rotação durante 5 min. e foi incubada no escuro à temperatura ambiente durante um período adicional de 40 min. Após esta etapa foi adicionado 50 uL de solução de parada a cada poço e a placa ficou em rotação durante 3 min.

A absorbância da amostra foi determinada em 450 nm dentro de 10 min. após a adição da solução de parada. Os valores dos padrões foram interpolados para obter os valores correspondentes as amostras de saliva, este resultado foi multiplicado por 5 para obter a concentração final de IgAs, expressas em ug/ mL.

2.7.6 Ácido Úrico

Este ensaio foi realizado por meio de kit comercial (BioclinTM; Minas Gerais, Brasil), com método do enzimático colorimétrico. Foram adicionados em tubos diferentes 25 ul da amostra, 25 uL do reagente padrão (ácido úrico 6,0 mg/dL, tampão < 500 mmol/L, estabilizante e conservante) e 25 uL de água destilada (branco), e a cada tubo foi acrescentado 1,0 mL de reagente enzimático (tampão \geq 100 mmol/L, 4-Aminoantipirina < 1 mmol/L, peroxidase < 18.000 U/L, uricase < 3.000 U/L, DHBS < 5 mmol/L, estabilizante, surfactante e conservante).

Todos os tubos foram bem homogeneizados, e permaneceram em banho-maria (37°C) durante 5 min. A absorbância da amostra foi determinada em 505 nm, acertando o zero com branco e a leitura foi realizada em, no máximo, 30 min. A concentração foi determinada a

partir deste cálculo: ((Abs. da Amostra x 6)/Abs. do Padrão), e o resultado foi expresso em mg/ dL.

2.7.7 Superóxido Dismutase (SOD)

Este ensaio foi realizado segundo Bannister e Calabrese (1987), onde a atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina.

Foi utilizado 10, 30 e 50 uL da amostra (homogeneizada em tampão glicina) e adicionado 10 uL de catalase (0,0024 g/mL de água destilada), 970 uL de tampão glicina (0,75g em 200 mL de água destilada à 32°C), 17 uL de adrenalina (60 mM em água destilada + 15 uL/mL de HCl).

A leitura foi realizada em 180s, com intervalo de 10s, medida espectrofotometricamente a 480nm e os valores foram expressos em Unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg proteína).

2.7.8 Catalase (CAT)

Este ensaio foi realizado segundo Aebi (1984), onde a atividade da Catalase foi determinada a partir da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), pela enzima presente na amostra.

Foi utilizada a solução com 40 uL de peróxido de hidrogênio em 25 mL de tampão KPE. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de KPE/H₂O₂ e 40 uL de amostra e homogeneizados.

A leitura foi realizada em 0 e 60s, e medida no espectrofotômetro a 240 nm. Os valores foram expressos em unidades de catalase por miligrama de proteína (U/mg proteína).

2.7.9 Glutathiona Reduzida (GSH)

Este ensaio foi realizado segundo Tietze (1969). Foram adicionados 100 uL de saliva em tubos contendo 200 uL de uma solução TCA (ácido tricloroacético) 10%, em seguida foram agitadas e centrifugadas a 4000xg durante 10 min. a 10° C. Para 200 uL do sobrenadante foi adicionado 700 uL de tampão de Tris-HCl (pH 8,9 e 400 mM), seguido pela adição de 100 uL de DTNB (2,5 mM) dissolvido em tampão de Tris-HCl (pH 8,9 e 40 mM) e permaneceram 10 min. à temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 412 nm em um leitor de microplaca (*EZ Read 400 Microplate Reader*).

2.7.10 Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

Este ensaio foi realizado segundo Keles et al. (2001). Foram adicionados 100 uL de saliva a tubos com uma solução de 500 uL de TCA (35%) e 500 ul de Tris-HCl (200 mM, pH 7,4). Estes tubos foram incubados durante 10 min. à temperatura ambiente. Adicionou-se aos tubos 1 mL de solução de Na₂SO₄ (2 M), seguido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (55 mM) e os tubos foram incubados a 95°C durante 45 min., ao final os tubos foram esfriados em gelo durante 5 min. e misturados após a adição de 1 mL de TCA (70%). Após esta etapa os tubos foram centrifugados a 15.000xg durante 3 min. A leitura foi realizada a 530 nm em um leitor de microplaca (*EZ Read 400 Microplate Reader*).

2.8 **Padronização da análise preliminar de proteômica**

2.8.1 Quantificação de Proteínas Totais

Foi aliquotado 1mL de saliva e adicionado inibidores de proteases: PMSF 100 uM, leupeptina 40 uM, pepstatina 1uM, EDTA 1 mM e 0,1 uL de endonuclease (Benzonaze[®]

Merck). Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. (4°C) para remover o material insolúvel.

Para precipitação a amostra foi dividida em 5 partes contendo 100 uL cada, mantendo sempre a 4°C. Após esta etapa foi adicionado ao material TCA (100%) e acetona (100%), gelada, na seguinte proporção e ordem, sem misturar:

- a) 100 uL de amostra;
- b) 800 uL de acetona 100% gelada;
- c) 200 uL de TCA 100% (à 4 °C em vidro coberto com papel alumínio).

Este material ficou precipitando durante 1h a -20°C e em seguida foi centrifugado durante 15 min. (14.000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado 5 vezes com 1 mL de acetona (100%) gelada, centrifugado por 15 min. (13.000 rpm, 4°C). Logo após o material foi ressuscitado em 10 uL de tampão de reidratação (Tampão de DIGE), e após esta etapa as 5 réplicas foram reunidas novamente, totalizando 50 uL.

A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford no espectrofotômetro, a curva padrão foi construída utilizando BSA (2000 ug/mL) e tampão de reidratação diluído 5 vezes, e a leitura foi feita utilizando o filtro de 595 nm. A leitura de todas as amostras foi finalizada em no máximo 30 min. A análise dos dados foi realizada no programa Microsoft Excel 2010.

2.8.2 Eletroforese 1D em mini gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Alíquotas de 10 uL contendo 5 ug de amostra foram misturadas a 10 uL de tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 125 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02%), DTT 0,2 M e desnaturadas a 96 °C por 5 min. Estas amostras foram então submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida formado pelo gel de empilhamento (acrilamida 30%, bis-acrilamida 2%, Tris-HCl 1 M pH 6,8, SDS 10%, TEMED 1% e PSA 10%) e pelo gel de corrida, na concentração de 12% (acrilamida 30%, bis-acrilamida 2%, Tris-HCl 1M pH 8,8, SDS 10%, TEMED 1% e PSA 10%) em tampão de corrida 1x (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3) a 100 V por 15 min., seguido de 150 V por 50 min.

Após a eletroforese o gel foi corado pelo método da prata amoniacal, que consistiu nas seguintes etapas: a) fixação: o gel foi incubado em uma solução contendo etanol 40%, ácido acético 10% durante 1h sob agitação e em seguida foi transferido para outra solução contendo

etanol 5%, ácido acético 5% por 2h ou *overnight* sob agitação. Ao fim desta etapa o gel foi lavado 2x em água ultrapura durante 5 min.; b) sensibilização: nesta etapa o gel foi transferido para uma solução contendo glutaraldeído 1% e acetato de sódio (0,5 M) onde permaneceu durante 30 min. sob agitação. Ao fim desta etapa o gel foi lavado em água ultrapura durante 5 min. por 8x; c) coloração: o gel foi corado por 30 min. com nitrato de prata amoniacal fresco sob agitação. Esta solução foi feita a partir de duas outras soluções: 6 mL de nitrato de prata 42 uM em 2,6 mL de hidróxido de amônio 25% e 0,4 mL de NaOH 10 N em 42,6 mL de água. Em seguida, o gel foi lavado em água ultrapura durante 4 min. por 4x e d) desenvolvimento: o gel foi transferido para uma solução contendo ácido cítrico 0,01% e formaldeído 0,1%, nesta etapa as bandas começaram a ser visualizadas e a parada da reação ocorreu com a adição da solução contendo ácido acético 2% e Tris 5%.

2.8.3 Focalização isoeletrica

Foi realizada a padronização da focalização isoeletrica inicialmente aplicando-se 5 ug de amostra em uma *IPG strip (Immobilized pH Gradients, GE Health)* com faixa pH 3 à 11, não linear, e comprimento de 18 cm. Uma vez obtidos os resultados utilizando *strips* de 18 cm pH 3 à 11, passou-se a utilizar *strips (Immobilized pH Gradients, GE Health)* de 18 cm com faixa pH 4 à 7, não linear, que permitem melhor resolução das proteínas pelo seu ponto isoeletrico. Nestas *strips* de 18 cm foram aplicados 150 ug de amostra.

Primeiramente as amostras foram diluídas na solução tampão de rehidratação contendo uréia (7 M), tiouréia (2 M), CHAPS (4 %), Tris (30 mM), DTT (1M 1%). Em seguida, foi acrescentado *D-streak* (1,2 %) (*GE Healthcare*) e *IPG buffer* (1 %) (*GE Healthcare*). As amostras foram incubadas a 25 °C por 30 min. sob agitação. A rehidratação do gel da strip foi de forma ativa a 30V durante 12h. A focalização isoeletrica foi realizada na plataforma *Ettan IPGphor II (GE Healthcare)* a 20 °C, de acordo com os seguintes parâmetros:

a) 30 V/12h, 100 V /1h, 500 V/ 1h, 2000 à 8000 V/ 1h e 8000 V até ser atingido um máximo de 40000 Vhs e 50uA;

b) 30 V/12h, 100 V /1h, 500 V/ 1h, 2000 à 8000 V/ 8h e 200 V até ser atingido um máximo de 80000 Vhs e 70uA;

c) 30 V/12h, 100 V /1h, 500 V/ 1h, 2000 à 8000 V/ 8h e 200 V até ser atingido um máximo de 100000 Vhs e 50uA;

2.8.4 Equilíbrio das strips e eletroforese bidimensional (2D)

Após a focalização cada *strip* foi lavada com água ultrapura e incubada em solução de equilíbrio (uréia 6 M, Tris-HCl pH 8,8 75 mM, glicerol 29,3% (v/v), SDS 2% (p/v)) contendo primeiramente 150 mg de DTT por 15 min. sob agitação, e em seguida solução de equilíbrio contendo 250 mg de IAA durante 20 min. sob agitação.

Para a segunda dimensão as *strips* foram lavadas em tampão de corrida 2x (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3), depositadas na parte superior de um gel de poliacrilamida 12% (acrilamida 30%, bis-acrilamida 2%, Tris-HCl 1M pH 8,8, SDS 10%, TEMED 1% e PSA 10%) e cobertas com uma mistura de agarose 0,5% e azul de bromofenol. A corrida foi realizada em tampão de corrida 2x (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3) a 15 °C sob as seguintes condições: 100 V por 15 min., seguido de 150 V por 50 min. para os mini géis e 5mA/gel por 30 min, seguido de 8 mA/gel por 1h e 60 mA/gel por 3 h para os géis maiores onde *strips* de 18 cm foram depositadas. Posteriormente, os géis foram corados pelo método da prata amoniacal como descrito no item 2.8.2., e os perfis de proteínas comparados pelo Image Master Platinum software v 6.0, (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden).

2.9 **Análise estatística**

As diferenças nos sprints individuais do THSR foram avaliadas através do ANOVA de uma via emparelhado com pós-teste de Newman-Keuls. E as diferenças nas análises salivares entre o PRÉ e PÓS foram avaliados utilizando teste *t de Student* pareado. Para a análise da função executiva foi utilizado teste *t de Student* não pareado para observar se havia diferença entre as pessoas com e sem erro no teste de Stroop. Para análise dos dados da torre de Hanoi os atletas foram separados por percentil de tempo de execução do teste, de modo que foram formados 4 grupos percentis de 25, 50, 75 e 100 (P25, P50, P75, P100) e para avaliar as diferenças entre esses grupos foi utilizado o ANOVA de uma via emparelhado com o pós-teste de Newman-Keuls. A expressão de proteínas no gel 2D foram analisadas em valores absolutos.

As análises estatísticas de teste *t de Student* pareada e não pareada, e ANOVA com pós-teste de Newman Keuls foram realizadas com o software *GraphPad Prism 5.0*. Para a divisão dos grupos por percentil foi utilizado o programa Microsoft Excel 2010. E a partir do software *ImageMaster 6.0* foi possível identificar os valores absolutos de aumento e/ou diminuição de expressão de proteínas na saliva.

Os dados em texto e tabelas são apresentados como média \pm DP. Para maior clareza, os dados das figuras estão apresentados como média \pm SEM. A significância estatística foi fixado em $p < 0,05$.

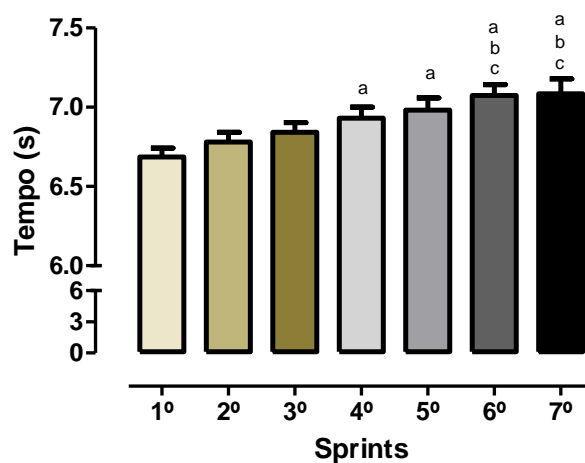
3 RESULTADOS

3.1 Parte I – Efeito do Teste Físico (Resposta Aguda)

3.1.1 Bangsbo Sprint Test (BST)

No protocolo de teste específico aplicado neste estudo, o tempo de cada sprint foi mais elevado a partir do quarto sprint (1,03 vezes; $p < 0,05$), que não foi compensado até ao final do teste, sugerindo uma característica exaustiva do BST (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Tempo dos sprints no Bangsbo Sprint Test (BST)

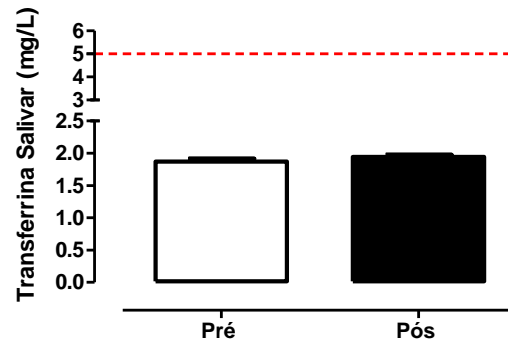


Legenda: a vs 1; b vs 2; c vs 3; $p < 0,05$.

3.1.2 Contaminação por sangue

Os valores de transferrina salivar não alcançaram o valor de 0,5 mg/ dL proposto como limiar de tolerância indicativo de contaminação cruzada com sangue. Este padrão foi mantido mesmo após os atletas terem sido submetidos ao BST (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Transferrina Salivar dos atletas submetidos ao BST

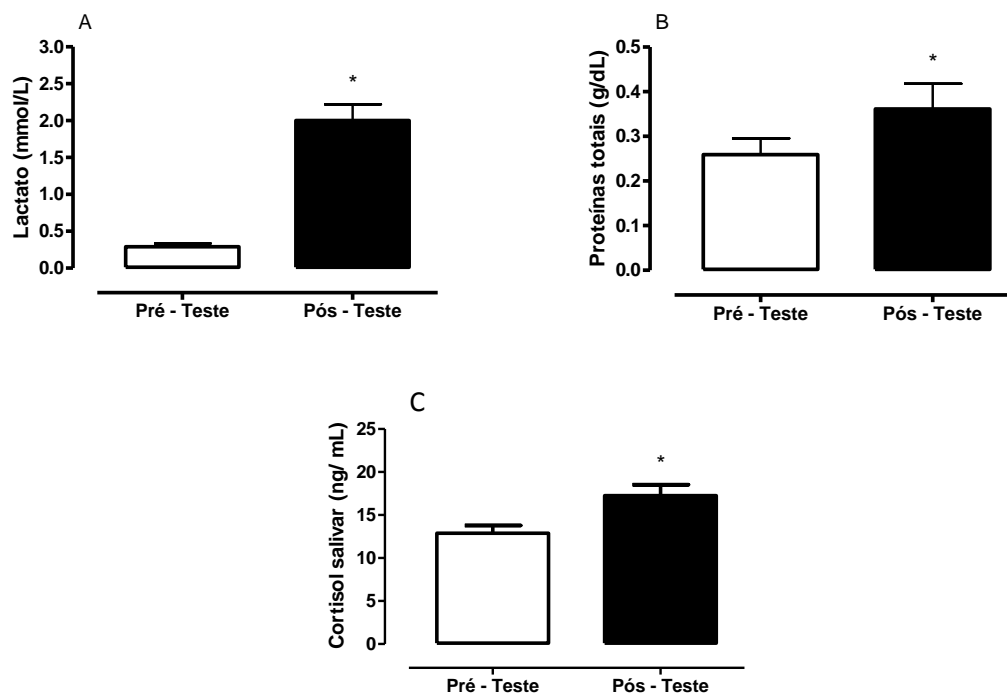


Legenda: os valores representam a média \pm o EPM dos atletas antes (Pré) e após (Pós) o BST. Teste *t-Student*. A linha pontilhada representa o limite de contaminação proposto por (SCHWARTZ; GRANGER, 2004).

3.1.3 Indicadores de Intensidade do Exercício

Os níveis de lactato na saliva aumentaram quando comparados com valores Pré-Teste (6,95 vezes; $p < 0,05$). A proteína total salivar seguiu um padrão semelhante do lactato, com níveis elevados após o BST (1,44 vezes; $p < 0,05$), de forma similar ao que foi observado para as concentrações de cortisol na saliva após o BST (1,34 vezes; $p < 0,05$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Indicadores de intensidade do exercício.

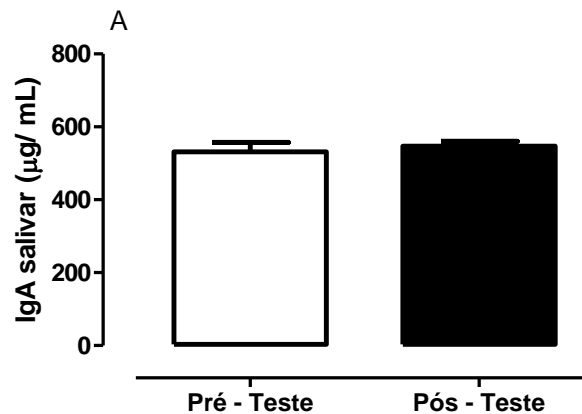


Legenda: * vs Pré - Teste; $p < 0,05$.

3.1.4 Indicador de Imunidade da Mucosa Oral

Os níveis de imunoglobulina-A salivar (IgA-s) não mostraram diferenças significativas após o BST em atletas de futebol (Gráfico 4).

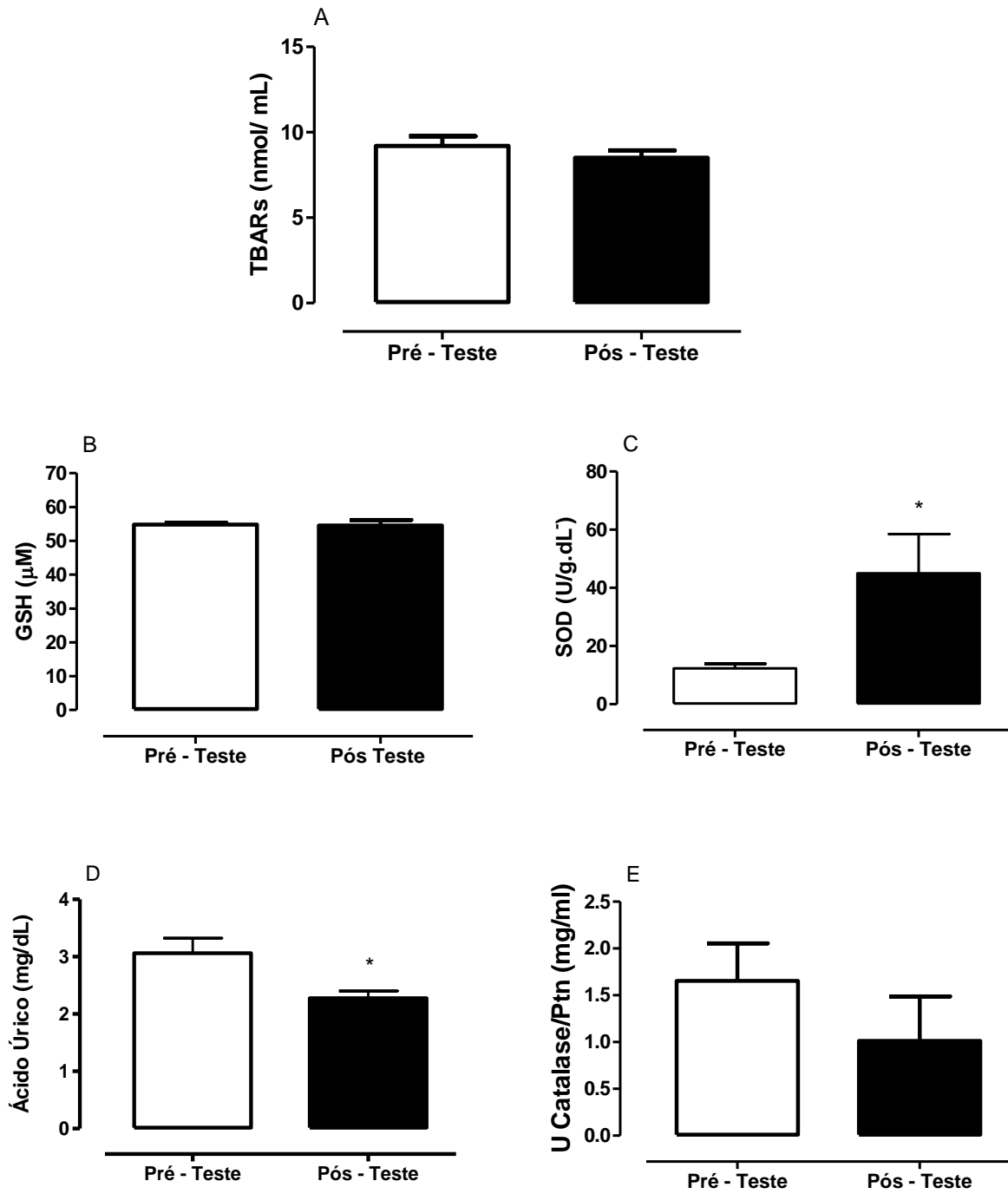
Gráfico 4 - Indicadores da imunidade da mucosa oral



3.1.5 Indicadores de Estresse Oxidativo

Os parâmetros de homeostase redox na saliva mostraram um padrão heterogêneo após o BST. Os níveis de GSH e TBARS não apresentaram diferenças significativas, enquanto os níveis de ácido úrico na saliva diminuíram após o teste físico (-26%; $p < 0,05$). No entanto a SOD salivar foi aumentada (3,63 vezes; $p < 0,05$), enquanto que os níveis de CAT na saliva não atingiram diferenças significativas (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Homeostase redox



Legenda: * vs Pré - Teste; $p < 0,05$.

3.2 Parte II – Avaliação da Função Executiva

3.2.1 Teste de Stroop (TSt) e Torre de Hanoi (ToH)

Durante o TSt quantificamos o número de erros, a partir de um total de 10 acertos possíveis, e observamos que a maioria dos atletas realizaram o teste sem cometer nenhum erro (Tabela 1).

Tabela 1 -Número de acertos de acordo com o percentual da amostra

Porcentagem da amostra	nº de acertos
72%	10
9,5%	9
4,5%	8
9,5%	7
4,5%	3

Nota: O número total de acertos possíveis no TsT são 10.

Na ToH quantificamos o número de movimentos e cronometramos o tempo de cada jogo, e a partir disto verificamos o máximo, o mínimo e a média relacionado a estes parâmetros (Tabela 2).

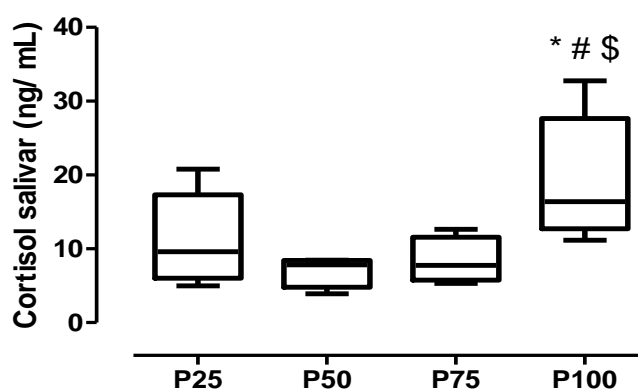
Tabela 2 - Movimento e tempo de realização da tarefa com 4 disco

	Movimentos	Tempo (s)
Máximo	155	882
Mínimo	17	38
Média	38,46	169,83
Dp	29,83	167,56
% Acerto em 15	0	---

3.2.2 Avaliação dos marcadores salivares com os testes de função executiva

As variáveis analisadas não mostraram associações significativas no TSt e na ToH. No entanto a estratificação dos valores de cortisol salivar em percentis identificou diferenças entre estes grupos para o ToH quando consideramos o tempo de execução do teste. Neste sentido, observamos maiores valores de cortisol no grupo localizado no percentil 100 (P100) que compreende entre 168 s e 862 s, em comparação com P75 que compreende entre 125 s e 162 s (2,32 vezes; $p < 0,05$), P50 que compreende entre 91 s e 119 s (2,72 vezes; $p < 0,05$) e P25 que compreende entre 60 s e 80 s (1,72 vezes; $p < 0,05$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Níveis de cortisol salivar por percentil de tempo na ToH



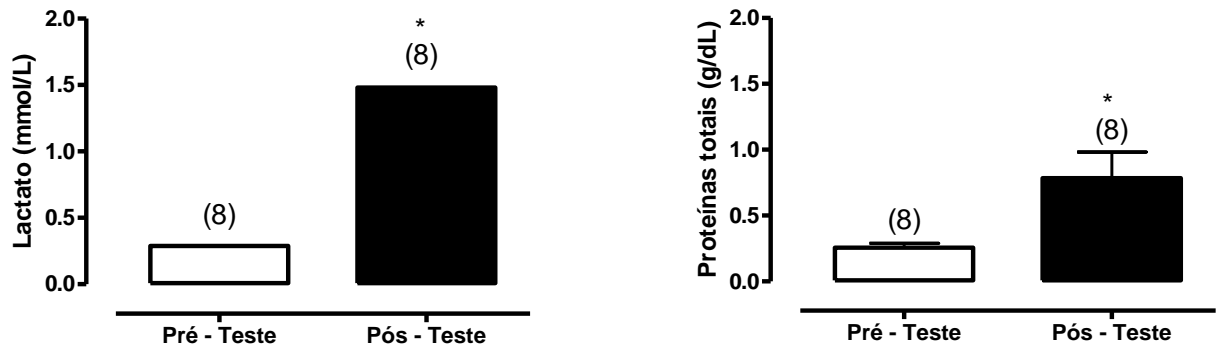
Legenda: * $p < 0,05$ vs P25; # vs P50; \$ vs P75

3.3 Parte III – Abordagem Preliminar de Proteômica

3.3.1 Caracterização da amostra

Para o estudo piloto com uma abordagem preliminar de proteômica, foi utilizada as amostras de 8 dos 32 atletas que realizaram o BST, cuja a intensidade do exercício, verificada pela variação na concentração de lactato, foi semelhante. E foi observado também neste grupo um aumento nos níveis de proteínas totais salivares (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Caracterização pela intensidade do exercício

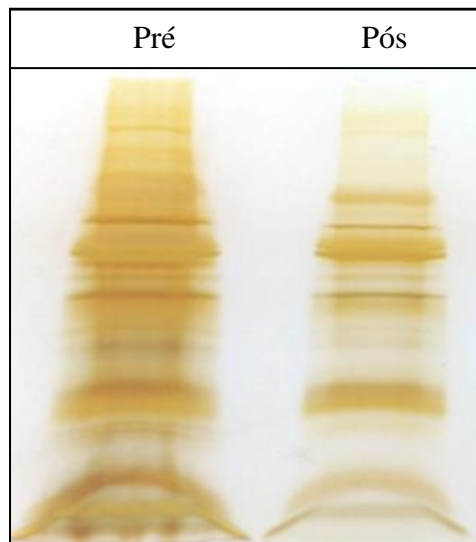


* vs Pré; $p > 0,05$

3.3.2 Perfil de proteínas em eletroforese unidimensional (1D)

Um ensaio piloto com eletroforese 1D foi realizado e a partir desta análise é possível observar uma modificação no perfil de proteínas presentes na saliva após o BST (Figura 8).

Figura 8 - Perfil (1D) de Proteínas Pré e Pós BST

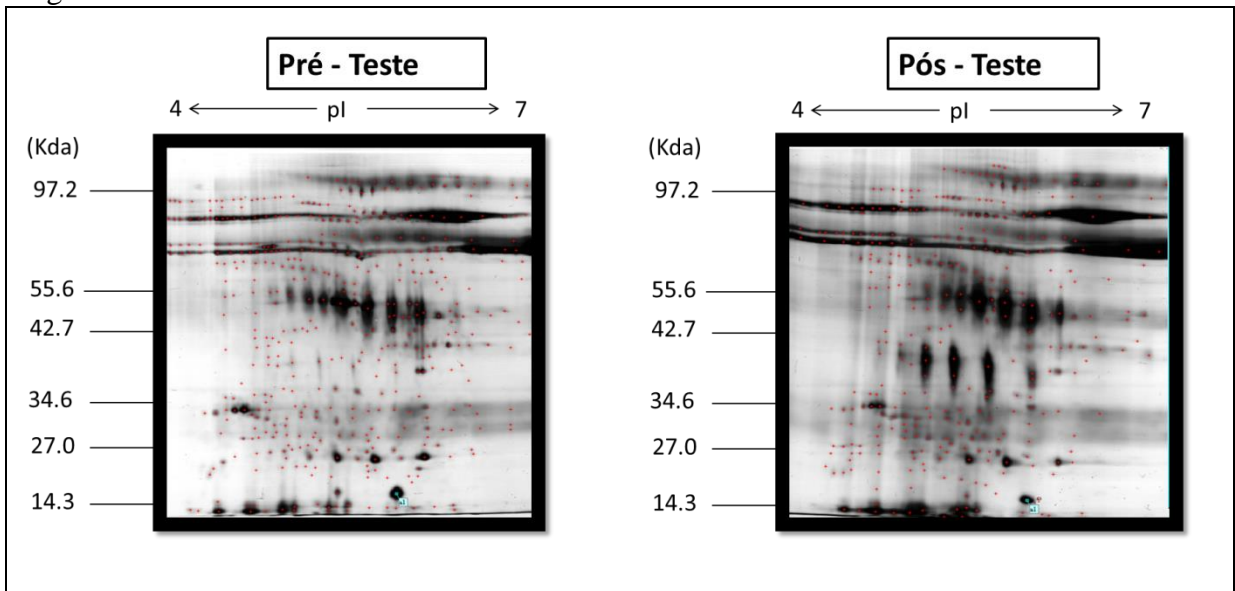


Legenda: Imagem ilustrativa do perfil de proteínas na saliva em dois momentos diferentes.

3.3.3 Perfil de proteínas em eletroforese bidimensional (2D)

Para a análise do perfil de proteínas no gel 2D, as 16 amostras foram separadas em dois momentos, pré (8) e pós (8) BST, e agrupadas formando um *pool* de proteínas representativas do grupo pré teste físico e outro *pool* de proteínas representando o grupo pós teste físico (Figura 9). A partir desta análise foi possível observar um perfil de expressão de proteínas diferente entre estes grupos. Foi identificado que 215 *spots* só estavam presentes no momento pré – teste, e após o BST (pós-teste) 63 *spots* aumentaram e 108 *spots* diminuíram a sua expressão.

Figura 9 – Eletroforese 2D



Legenda: Perfil de proteínas no gel 2D, separadas por peso molecular e ponto isoelétrico.

4 DISCUSSÃO

Na primeira parte deste estudo atentamos principalmente para as respostas bioquímicas salivares a um teste de desempenho físico. Ao analisar os resultados de tempos de sprints observamos que apesar dos atletas se encontrarem em um nível profissional, o desempenho destes está abaixo, porém próximo, daquele apresentado por jogadores de futebol da categoria Junior que participaram do estudo de Silva et al. (2011). Neste estudo, metade dos participantes faziam parte da equipe campeã nacional da categoria dois meses antes dos testes e a outra metade também estava em uma equipe que se encontrava entre as melhores do país.

Analisando somente o BST, identificamos que o mesmo foi intenso o suficiente para produzir uma fadiga progressiva nos atletas de futebol, como mostrado pelos tempos de *sprint* com diferenças cada vez mais significativas a partir da quarto *sprint*.

A partir deste protocolo de teste físico foi analisado a respostas bioquímicas salivares a este tipo de estresse. Um fator a ser considerado quando se analisa a saliva é que as moléculas celulares encontram-se em níveis muito baixos, na faixa de picogramas ou nanogramas. No entanto, este problema foi superado graças aos recentes avanços tecnológicos em biologia molecular, bem como a disponibilidade atual de equipamentos extremamente sensíveis que são facilmente capazes de medir os baixos níveis de moléculas biologicamente ativas na saliva, com os consequentes benefícios para a pesquisa de biomarcadores neste fluido (TIWARI, 2011).

Neste contexto, o diagnóstico da doença a partir da saliva, assim como a análise do comportamento de biomarcadores salivares em resposta a um estímulo físico, é um campo de investigação crescente com implicações básicas e clínicas. É importante considerar que a saliva total é constituída por secreções provenientes de várias fontes (NIEUW AMERONGEN et al., 2007). Com isso, é de fundamental importância avaliar se existe a contaminação por sangue neste tipo de amostra, uma vez que isto poderia interferir em alguns parâmetros bioquímicos como, por exemplo, o cortisol salivar (KIVLIGHAN et al., 2004). No entanto, observamos em nossas amostras que todas ficaram abaixo de 0,5 mg / dL, considerado como limiar de tolerância da amostras (SCHWARTZ; GRANGER, 2004), isso indica que todos os parâmetros bioquímicos analisados no presente estudo não sofreram influência de uma possível contaminação por sangue.

Nossos resultados demonstram que alguns parâmetros analisados na saliva sofreram alterações e outros não se modificaram em resposta ao BST. Após o teste físico a proteína total salivar aumentou, e esse aumento está relacionado com a intensidade do exercício (DE OLIVEIRA et al., 2010). É importante ressaltar que o controle de secreção salivar é mediado pelo sistema nervoso parassimpático (SNP) e simpático (SNS), onde o SNP é responsável por uma vasodilatação que aumenta a fluidez e a quantidade de saliva, e o SNS gera uma vasoconstrição que diminui o fluxo salivar e aumenta a quantidade de proteínas e compostos orgânicos e inorgânicos na saliva (DENNIS; YOUNG, 1978; SCHNEYER, 1976). Com isso o aumento de proteínas totais após o BST pode ser explicado pelo aumento da intensidade do exercício que está diretamente relacionado com ativação do SNS (STAINSBY; BROOKS, 1990).

Além disso, o lactato salivar seguiu o mesmo padrão de resposta da proteína total salivar, o que sugere uma maior participação do metabolismo anaeróbio (TEKUS et al., 2012). O BST envolve a produção de energia principalmente pelo metabolismo anaeróbio que tem como produto final altos níveis de lactato sanguíneo (BANGSBO et al., 2007), e alguns estudos mostraram uma correlação positiva, neste parâmetro, entre o plasma e a saliva (MENDEZ et al., 1976; OHKUWA et al., 1995; SANTOS et al., 2006; ZAGATTO et al., 2004). Curiosamente, o VO_2 máximo parece ser inversamente associado ao BST sugerindo que a capacidade aeróbia poderia ter um papel importante durante a recuperação para permitir a adequada reposição de substrato energético (JONES et al., 2013). Na verdade, as adaptações específicas a nível músculo esquelético em humanos parecem ser determinantes para o desempenho de alta intensidade (FAISS et al., 2013). Estudos experimentais mostraram que ratos submetidos a treinamento intervalado de alta intensidade, apresentam adaptações mitocondriais nos músculos esqueléticos que favorecem um fenótipo oxidativo, que é mais proeminente em tecidos onde as fibras glicolíticas são predominantes (RAMOS-FILHO et al., 2015). Estes resultados sugerem que os testes intermitentes de alta intensidade semelhante ao protocolo atual usado neste estudo também poderia oferecer possibilidades interessantes para vias metabólicas mistas durante o treinamento físico em atletas de esportes coletivos.

Quanto ao aumento da concentração de cortisol na saliva após o teste físico, é um indicativo da influência do BST no eixo hipotálamo-hipófise. A sua secreção parece estar diretamente estimulada pela intensidade do exercício, no entanto muitos treinadores associam esse aumento com a diminuição do desempenho, provavelmente devido aos seus efeitos catabólicos (BROWNLEE; MOORE; HACKNEY, 2005). Na verdade, as sessões de treinamento usando protocolos de exercícios resistidos com maior número de séries e

repetições induzem níveis de cortisol salivar maior, quando comparado com as sessões de treinamento de baixo volume, sugerindo que o trabalho acumulado associado com curtos intervalos de descanso é mais relevante para a produção de cortisol do que a intensidade do exercício sozinho (CREWETHER et al., 2008).

De uma maneira geral, está bem estabelecido que o exercício físico quando bem planejado, apresenta um impacto favorável na saúde e desempenho de seus praticantes (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006; MEEUSEN et al., 2006). Selye (1951) propôs um modelo de síndrome de adaptação geral, onde a partir do momento que organismo sofre um estresse ele entra em estado de alarme e concomitante a isso ocorre uma queda de desempenho, logo em seguida ocorrem adaptações que aos poucos vão aumentando o desempenho até o ponto em que os dois, tanto as adaptações quanto o desempenho atingem um platô. A partir desse momento a carga de estresse que for imposta a este organismo pode gerar duas respostas distintas, quando adequada acarreta numa resposta rebote levando a adaptações benéficas e o aumento do desempenho, que quando inadequada ocasiona adaptações deletérias juntamente com uma queda de desempenho.

Alguns atletas são submetidos a estas cargas inadequadas que podem levar principalmente a queda do desempenho físico. Além disso, pode levar também a uma diminuição da imunidade (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006; SMITH, 2000).

Com isso alguns modelos sobre a relação entre exercício físico e o risco de infecções do trato respiratório superior foram propostos, o primeiro modelo que surgiu para explicar a relação entre o exercício e a suscetibilidade à infecções foi o modelo da curva em “J” de Nieman (1994). O modelo de curva em forma de “J” tem sido bem aceito, sugerindo que a atividade física de intensidade moderada pode melhorar a função imunológica, enquanto que o sedentarismo ou quantidades excessivas, prolongadas e intensas de exercício físico podem prejudicar a função imunológica (NIEMAN, 1994).

Pedersen & Ullum (1994) propuseram o modelo da “Janela Aberta”, defendendo que após a realização de exercícios físicos intensos e de longa duração o indivíduo seria induzido a uma imunossupressão. Durante esse período que poderia durar entre 3 à 72 horas, as bactérias e vírus teriam uma oportunidade para entrar no organismo, aumentando assim o risco de infecções, e principalmente as infecções do trato respiratório superior (NIEMAN, 2000). Outro modelo é o da curva em forma de “S” que têm como base o modelo da curva em forma de “J”, apresentando uma modificação e defendendo que para atletas de elite a curva que melhor se ajustaria seria em forma de S (MALM, 2006). Esse modelo explica que com elevadas cargas de treinos, que necessitam ser desempenhadas pelos atletas, estes passariam

por momentos mais suscetíveis às infecções do trato respiratório. Isso foi formulado por meio de dados referentes a carga de treinamento e a incidência de episódios de infecção do trato respiratório superior em um corredor de elite, que foi acompanhado por um período de 16 anos (MALM, 2006).

Neste contexto, o exercício físico é um importante modulador das características do sistema imune, sobretudo do comportamento da IgA-s, componente fundamental na proteção de infecções do trato respiratório superior ou ITRS (SILVA, 2009). Além disso, os efeitos do exercício físico sobre este componente parecem estar relacionados com os parâmetros de duração e/ou intensidade. O treinamento de intensidade moderada exerce efeitos estimulantes sobre os níveis de IgA-s (AKIMOTO et al., 2003 ; SHIMIZU et al., 2007) , enquanto o exercício de alta intensidade está relacionada com a supressão imunológica aguda, que também está associada com infecções do trato respiratório superior (GLEESON et al., 1999; GLEESON; PYNE, 2000; NIEMAN et al., 2002). Os nossos resultados mostraram que o BST não alterou os níveis de IgA-s, é possível que isto seja influenciado pela a característica intermitente do protocolo escolhido, como observado anteriormente por Laing et al. (2005), Thomas et al. (2009), e Sari-Sarraf et al. (2006).

Ao avaliarmos o estado redox, os parâmetros salivares analisados parecem ser afetados de formas diferentes pelo exercício físico. Para nosso conhecimento, poucos estudos avaliaram o efeito do exercício físico sobre a homeostase redox em atletas adultos. González et al (2008), relataram aumento dos níveis de ácido úrico com diminuição de hidro peróxidos lipídicos na saliva após a 10.000 m de corrida. O ácido úrico é o principal antioxidante presente na saliva, responsável por mais de 70% da capacidade antioxidante neste fluido (AMES et al., 1981; MOORE et al., 1994), e suas propriedades são atribuídas à capacidade de quelar metais de transição e por reagir com oxidantes biológicos, tais como o ácido hipocloroso e radical hidroxila, além de ser um excelente eliminador de espécies reativas de nitrogênio (BUTTINO et al., 2002; KUSKAYA et al.,2005). Curiosamente, Deminice et al (2010) observou um aumento significativo na concentração de ácido úrico com níveis de TBARS inalterados após um protocolo de treino de contra-resistência. Estes estudos sugerem que a homeostase redox salivar pode estar relacionada às demandas de formação específica, no entanto outros fatores também podem estar envolvidos.

Nossos resultados mostraram que os parâmetros antioxidantes parecem ser regulados diferencialmente em resposta ao BST em jogadores de futebol. TBARs salivares não foram afetados pelo teste físico neste estudo, interessante o ácido úrico foi menor, enquanto que os níveis de GSH não mostraram diferenças significativas. Os dados referentes a

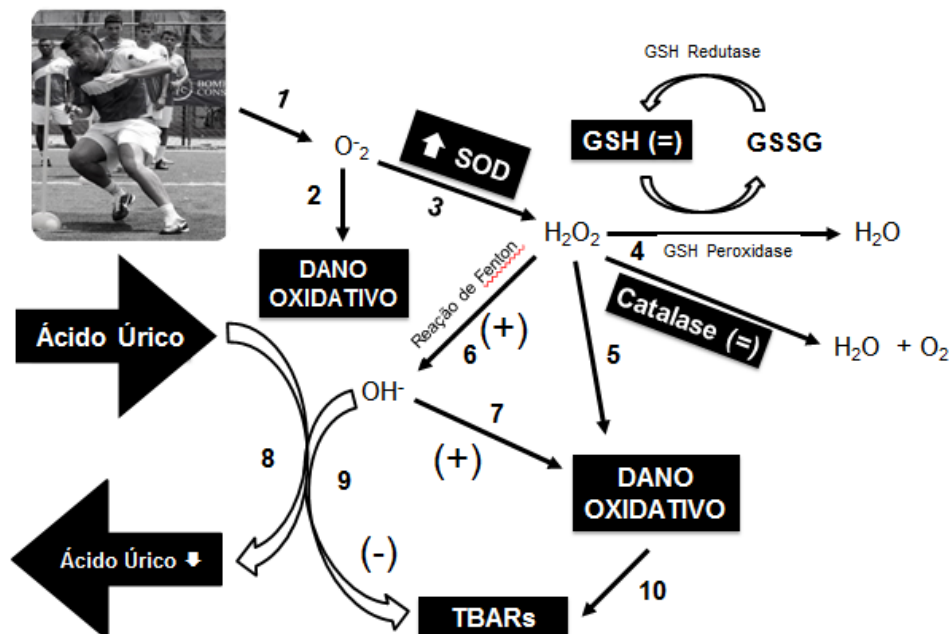
respostas de GSH ao exercício na saliva são escassos. O GSH tem ação antioxidante relacionada com propriedades redutoras da sulfidril (-SH) (KIDD, 1997). Os nossos resultados não mostraram nenhuma alteração significativa em GSH após o BST, o que corrobora com os achados anteriores (DEMINICE et al., 2010). O ácido úrico parece ser responsável por 70% ou mais da capacidade antioxidante da saliva e é normalmente descrito como o principal antioxidante neste fluido (AMES et al., 1981). Por outro lado, o decréscimo observado por nós neste componente pode ser um fator principal contra peroxidação lipídica induzida pelo exercício. Além disso, as concentrações de SOD salivar elevada ocorreram provavelmente devido ao aumento da produção de ROS após o exercício físico (CAVAS et al., 2005).

A avaliação da CAT salivar foi inicialmente realizada por Kraus, Perry e Nickerson (1958), mas ainda é escasso na literatura estudos sobre a influência do exercício físico neste componente. Tsuber, Kadamov e Tarasenko (2014) observaram efeitos estimulantes após estresse psicossocial. Neste estudo os níveis de CAT não foram significativamente afetados pelo exercício físico.

Esta resposta específica em enzimas antioxidantes salivares também poderia sugerir padrões diferentes para mecanismos induzido pelo exercício. Uma superprodução de ROS durante a re-oxigenação por dano via isquemia-reperfusão produz um estado de estresse oxidativo. Estas moléculas poderiam ativar os componentes redox-sensíveis devido ao aumento da exposição a ROS e induzir a expressão de enzimas antioxidantes como uma estratégia adaptativa (GOMEZ-CABRERA et al., 2005; POWERS; JACKSON, 2008).

De maneira geral podemos observar que a partir da saliva, um material biológico não invasivo e de fácil acesso, foi possível mapear o estado físico dos atletas, onde um exercício intermitente de alta intensidade, caracterizado pelo aumento dos níveis de lactato, proteínas totais e cortisol, não alterou os níveis de IgA-s, indicando que o BST não afetou o estado imunológico da mucosa oral. E respostas diferentes relacionadas aos marcadores de estado redox sugerem que não houve estresse oxidativo, apenas uma sinalização redox em resposta ao estímulo (Figura 10).

Figura 10 – Esquema de sinalização redox salivar em atletas de futebol induzidos pelo BST



Legenda: (1) Exercício aumenta a produção e ânion superóxido; (2) Ânion superóxido causa dano oxidativo; (3) O aumento da superóxido dismutase sugere uma redução do ânion superóxido à peróxido de hidrogênio, uma molécula menos reativa; (4) O peróxido de hidrogênio é convertido em água pela catalase e pelo sistema da glutatona, que não foram alteradas; (5) O peróxido de hidrogênio também causa dano oxidativo, porém menos que o ânion superóxido; (6) O peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radical hidroxila, uma molécula mais reativa, pela reação de Fenton; (7) O radical hidroxila causa mais dano oxidativo que o peróxido de hidrogênio; (8) A diminuição de ácido úrico sugere a ação do mesmo como antioxidante, reagindo com o radical hidroxila; (9) Uma menor quantidade de radical hidroxila causaria menos peroxidação lipídica, observada pela manutenção dos TBARs; (10) TBARs é um marcador de peroxidação lipídica que indica um possível dano oxidativo a membrana celular.

Um dado chamou bastante a atenção ao analisar os resultados obtidos na primeira e segunda parte do estudo, observamos que 56% e 61% dos atletas, respectivamente, estavam com os níveis de cortisol salivar, em repouso, acima de valor de referência descrito pelo kit utilizado para realizar o ensaio. Esta concentração elevada pode ser reflexo de uma carga cumulativa de estresse gerado ao longo dos períodos preparação e competição, que pode gerar este tipo de resposta crônica (BANFI et al., 1993; HANDZISKI et al., 2006; MACKINNON et al., 1997), porém não necessariamente indica algum quadro deletério neste grupo. Por outro lado, o estudo de Lara et al. (2013) mostrou que a concentração de cortisol plasmático elevada está diretamente associado a algum tipo de prejuízo cognitivo, em pessoas com e sem doença mental. Como já está bem estabelecido na literatura uma correlação positiva entre as concentrações sanguíneas e salivares de cortisol (MCGUIGAN et al., 2003; POWELL et al., 2015; STUPNICKI; OBMINSKI, 1992), bem como validado a utilidade prática e a precisão

deste marcador (GATTI; DE PALO, 2011), nós avaliamos na segunda parte do estudo se este grupo de atletas teria algum prejuízo no cumprimento de tarefas cognitivas, e além disso identificar se outros componentes salivares teriam correlação com a execução de dois testes específicos.

Sendo a cognição um termo coletivo para funções corticais superiores, tais como pensar, lembrar, conhecer, planejar e analisar (DARDIOTIS et al., 2012), e o futebol um esporte que tem o seu resultado final determinado, juntamente com outros fatores, por um bom desempenho cognitivo (MANNING; LEVY, 2006; VERBURGH et al., 2014), a análise do desempenho nos testes para avaliar a função executiva nos nossos atletas associado aos valores de repouso de alguns marcadores salivares podem fornecer informações relevantes para a avaliação e controle do treinamento.

A função executiva é um conceito neuropsicológico que se aplica ao processo cognitivo responsável pelo planejamento e execução de atividades incluindo iniciação de tarefas, memória de trabalho, atenção sustentada e inibição de impulsos, por exemplo (BRENNAN et al., 1997; SHANNON et al., 2015). E estes fatores, juntamente com o desempenho físico, são de fundamental importância para um bom desempenho esportivo (STØLEN et al., 2005; VESTBERG et al., 2012).

Na segunda parte do presente estudo os atletas foram submetidos ao TSt e ao ToH. O TSt exercita os lobos frontais do cérebro responsáveis por nosso planejamento e ação, utilizado com a finalidade de avaliar a atenção seletiva. Em outras palavras pode se dizer que este teste se refere a capacidade de manter a meta em uma atividade, inibir a tendência de fornecer respostas impulsivas e a velocidade no processamento de informações (BARBOSA et al., 2009; STROOP, 1935). Já o ToH é utilizado para avaliar memória de trabalho e o planejamento e solução de problemas (BALACHANDAR et al., 2015).

Não foi encontrada correlação de nenhum dos parâmetros analisados com o desempenho nos testes para avaliar a função executiva, com isso separamos o desempenho dos atletas nos testes em percentis e observamos que, somente no ToH, os atletas que levaram mais tempo para realizar a tarefa possuem níveis de cortisol significativamente maiores do que aqueles que realizaram a tarefa em um tempo menor.

Como destacado anteriormente, as características cognitivas são de suma importância para o desempenho esportivo, e os dados sugerem que atletas com níveis elevados de cortisol na saliva, em repouso, têm a memória de trabalho e o planejamento e solução de problemas prejudicada, mas a atenção seletiva e a velocidade de processamento de informações parecem não ser afetados pelos níveis de cortisol em repouso.

Como podemos ver a bioquímica juntamente com alguns testes e estratégias nos fornece dados extremamente relevantes para o acompanhamento do treinamento de atletas de futebol (ABRANTES et al., 2014; BALACHANDAR et al., 2015; GATTI; DE PALO, 2011; DE OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2009; STROOP, 1935; WANG et al., 2015). Contudo outra forma de compreender um pouco destas respostas agudas ao exercício é através das Ômicas, uma ferramenta que possibilita um novo olhar sobre determinados parâmetros (BASSINI; CAMERON, 2014; PFAFFE et al., 2011).

As ômicas partem de uma ótica generalizada de determinado fluido ou amostra biológica e sem uma hipótese pré-suposta (HORGAN; KENNY, 2011). A genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e metagenômica tem contribuído para a identificação e caracterização de componentes salivares, incluindo DNA, RNA, proteínas, metabolitos, e microrganismos (CUEVAS-CORDOVA; SANTIAGO-GARCIA, 2014).

Loo et al. (2010) relataram, através de um estudo de proteômica, que 27% das proteínas encontradas na saliva também estão presentes no plasma, sugerindo que a saliva poderia ser utilizada como uma alternativa ao sangue para testes de diagnóstico. Os restantes 73% de proteínas que estão presentes na saliva, mas ausente no plasma, apresentam uma oportunidade de identificar novos marcadores moleculares exclusivos desse fluido. Além disso, cerca de 40% das proteínas do plasma que são considerados candidatos a marcadores para a doença cardiovascular, câncer, acidente vascular cerebral, assim como para um bom desempenho físico, podem ser encontradas na saliva.

Ambos os fluidos mostram uma grande diversidade em termos de tipo e concentração de proteína. No sangue, 99% do conteúdo total de proteínas é representado por 22 proteínas mais abundantes; em contraste, as 20 proteínas mais abundantes na saliva total representam apenas 40%. Algumas das proteínas mais abundantes no plasma também são encontradas na saliva em concentração moderadamente elevada. Por outro lado, apenas algumas proteínas que são muito abundantes na saliva são encontradas no plasma em concentrações semelhantes (YAN et al., 2009). Estes dados revelam uma oportunidade significativa para o estudo de potenciais biomarcadores na saliva usando abordagens proteômicas.

Concordâncias também estão presentes na distribuição do proteoma da saliva e do plasma. Em comparação com o proteoma humano total, o proteoma da saliva e do plasma estão sobre-representados em termos de função catalítica, componentes citoplasmáticos e do citoesqueleto extracelulares, moléculas de resposta a estímulos e ao estresse, organização celular, biogênese, e proteínas de ligação. Por outro lado, ambos os fluidos estão sub-representados em comunicação celular e componentes intracelulares, ligação de ácido

nucleico, função do regulador de transcrição, atividade do transportador, e atividade transdutor de sinal, e outros processos metabólicos primários (LOO et al., 2010). Outro achado importante foi a identificação de imunoglobulinas entre proteínas com uma alta coincidência em ambos os fluidos. Esta observação levanta a possibilidade de que outros anticorpos detectados no plasma pode ser detectada na saliva, o que poderia contribuir para o diagnóstico e monitorização da doença (LOO et al., 2010; YAN et al., 2009), bem como para avaliar e controlar o treinamento físico. Proteomas salivares e do plasma contêm um grande número de proteínas associadas com desordens genéticas, alguns dos quais têm fenótipos reconhecidos, aumentando o valor potencial de proteínas salivares como biomarcadores para o acompanhamento de uma série de comportamentos (WONG, 2006; YAN et al., 2009; ZHANG et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2007).

Neste sentido na terceira parte do estudo realizamos uma abordagem preliminar de proteômica, onde conseguimos identificar um perfil diferenciado de proteínas expressas na saliva, ao comparar um *pool* de amostras pré com pós BST. Inicialmente, através da eletroforese 1D, foi possível visualmente observar perfis completamente diferentes. E a partir da eletroforese 2D PAGE observamos que o BST induziu a expressão diferencial de proteínas, visto que não surgiram proteínas novas após o teste, e dezenas de proteínas foram up-reguladas e down-reguladas após o BST. Sugerindo que após uma análise proteômica diferencial mais precisa, estas proteínas possam ser candidatas a marcadores de desempenho físico.

De uma maneira geral, as principais críticas a respeito da utilidade da saliva em diagnósticos estão relacionadas as suas variações frente a diferentes fatores, uma vez que a quantidade e composição da saliva são influenciadas pelo ritmo circadiano, estimulação da glândula, dieta, idade, sexo e condição fisiológica, entre outros (PFAFFE et al., 2011). Não levar esses fatores em consideração poderia gerar inconsistências nas correlações entre biomarcadores e seu comportamento em resposta a um determinado estímulo. Contudo a finalidade do presente trabalho não é a utilização da saliva para o diagnóstico de doenças, e sim observar o seu comportamento em resposta ao exercício físico e a partir desta informação identificar se é possível avaliar o desempenho esportivo.

Neste sentido, vale ressaltar que diferentes condições patológicas podem causar alterações semelhantes em biomoléculas; por exemplo, mudanças em interleucinas são observadas como resultado de vários processos inflamatórios diferentes; igualmente com imunoglobulinas e doenças imunes. Por outro lado, os procedimentos de coleta, integridade da amostra e condições de armazenamento também podem causar alterações nos marcadores

bioquímicos, produzindo resultados inconsistentes (AL-TARAWNEH et al., 2011). Todos estes fatores foram bem controlados durante o estudo para não permitir um viés no momento de análise dos dados.

Sendo assim, a interpretação e aplicação desses biomarcadores em estudos de alta qualidade é uma grande promessa. E isto irá aumentar o entendimento da patogênese subjacente de uma doença ou derivada de um exercício realizado de forma inadequada, e levar a melhorias nas estratégias de prevenção (CARRINGTON; HOELZEL, 2006).

CONCLUSÃO

Concluimos que a saliva é um fluido, alternativo ao sangue, que permite mapear o estado físico de atletas de futebol. Neste contexto, foi possível demonstrar que o BST pode ser conduzido em atletas de futebol sem riscos de afetar negativamente o estado imunológico da mucosa oral, fato que minimiza possíveis riscos de ITRS como observado pelos níveis IgA-s inalterados, e os parâmetros de carga da sessão de exercício podem ser monitorados através da avaliação do cortisol salivar.

Além disso, o ácido úrico pode ser um fator-chave para a manutenção dos níveis de TBARs na saliva durante o exercício físico agudo intermitente de alta intensidade. Curiosamente, níveis mais elevados de SOD na saliva parece atuar como um mecanismo de segunda linha de defesa contra a produção posterior de ROS induzida pelo exercício físico pela via de isquemia-reperfusão.

A partir dos dados dos testes de função executiva, foi possível observar a influência negativa dos níveis elevados de cortisol salivar no repouso sobre a função executiva dos atletas avaliados. Por outro lado, a partir de uma abordagem preliminar de proteômica verificamos que o teste físico intenso induz a expressão diferencial de proteínas na saliva em atletas de futebol. Com isso, em uma perspectiva otimista, através de uma análise proteômica mais precisa, estas proteínas diferencialmente expressas podem ser candidatas a potenciais marcadores de desempenho físico.

REFERÊNCIAS

- AAS, Jørn A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, 2005.
- ABRANTES, Catarina; MAÇÃS, Vitor; SAMPAIO, Jaime. Variation in football players' sprint test performance across different ages and levels of competition. **Journal of sports science & medicine**, v. 3, n. YISI 1, p. 44, 2004.
- AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AKIMOTO, T. et al. Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. **British journal of sports medicine**, v. 37, n. 1,
- AL-TARAWNEH, Sandra K. et al. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 15, n. 6, p. 353-361, 2011.
- ALVAREZ, Julie A.; EMORY, Eugene. Executive function and the frontal lobes: a meta-analytic review. **Neuropsychology review**, v. 16, n. 1, p. 17-42, 2006.
- AMES, Bruce N. et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 11, p. 6858-6862, 1981.
- BAKER, J.; RAMSBOTTOM, R.; HAZELDINE, R. Maximal shuttle running over 40 m as a measure of anaerobic performance. **British journal of sports medicine**, v. 27, n. 4, p. 228-232, 1993.
- BALACHANDAR, Rakesh et al. Classic tower of Hanoi, planning skills, and the Indian elderly. **East Asian Archives of Psychiatry**, v. 25, n. 3, p. 108, 2015.
- BALL, S. D.; ALTENA, T. S.; SWAN, P. D. Comparison of anthropometry to DXA: a new prediction equation for men. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. 11, p. 1525-1531, 2004.
- BANFI, G. et al. Usefulness of free testosterone/cortisol ratio during a season of elite speed skating athletes. **International journal of sports medicine**, v. 14, n. 7, p. 373-379, 1993.
- BANGSBO, Jens; NØRREGAARD, Lene; THORSOE, F. Activity profile of competition soccer. **Canadian journal of sport sciences= Journal canadien des sciences du sport**, v. 16, n. 2, p. 110-116, 1991.
- BANGSBO, Jens. **Fitness training in football: a scientific approach**. August Krogh Inst., University of Copenhagen, 1994.
- BANGSBO, Jens; MOHR, Magni; KRUSTRUP, Peter. Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player. **Journal of sports sciences**, v. 24, n. 07, p. 665-674, 2006.

- BANGSBO, Jens; IAIA, Fedon Marcello; KRUSTRUP, Peter. Metabolic response and fatigue in soccer. **International journal of sports physiology and performance**, v. 2, n. 2, p. 111, 2007.
- BANNISTER, Joe V.; CALABRESE, Lilia. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis, Volume 32**, p. 279-312, 2006.
- BARBOSA, Daniel Fernandes et al. Resposta cardiovascular ao Stroop: comparação entre teste computadorizado e verbal. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 4, p. 507-511, 2010.
- BASSINI, Adriana; CAMERON, L. C. Sportomics: Building a new concept in metabolic studi
- BATTINO, M. et al. The antioxidant capacity of saliva. **Journal of clinical periodontology**, v. 29, n. 3, p. 189-194, 2002.
- BELART, M.; RANCÉ, L. Nivell Llidar per a escolars (8-14 anys). Barcelona: Generalitat de Catalunya, 1991.
- BOMPA, Tudor O. **Periodização: teoria e metodologia do treinamento**. Phorte, 2002.
- BRANDÃO, Maria Regina Ferreira. **Fatores de stress em jogadores de futebol profissional**. 2000. Tese de Doutorado. Faculdade de Educação Física da Universidade Estadual de Campinas.
- BRENNAN, Mark; WELSH, Marilyn C.; FISHER, Celia B. Aging and executive function skills: An examination of a community-dwelling older adult population. **Perceptual and motor skills**, v. 84, n. 3c, p. 1187-1197, 1997.
- BROWNLEE, Kaye K.; MOORE, Alex W.; HACKNEY, Anthony C. Relationship between circulating cortisol and testosterone: influence of physical exercise. **Journal of sports science & medicine**, v. 4, n. 1, p. 76, 2005.
- BRUGNOLO, A. et al. An updated Italian normative dataset for the Stroop color word test (SCWT). **Neurological Sciences**, p. 1-8, 2015.
- CARRINGTON, Mary; HOELZEL, A. Rus (Ed.). **Molecular epidemiology: a practical approach**. Oxford University Press, 2001.
- CAVAS, L.; ARPINAR, P.; YURDAKOC, K. Possible interactions between antioxidant enzymes and free sialic acids in saliva: a preliminary study on elite judoists. **International journal of sports medicine**, v. 26, n. 10, p. 832-835, 2005.
- CELECOVÁ, Viera et al. Salivary markers of oxidative stress are related to age and oral health in adult non-smokers. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, n. 3, p. 263-266, 2013.
- CHIAPPIN, Silvia et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, n. 1, p. 30-40, 2007.
- CHICHARRO, José L. et al. Saliva composition and exercise. **Sports medicine**, v. 26, n. 1, p. 17-27, 1998.
- COELHO, Daniel Barbosa et al. Limiar anaeróbico de jogadores de futebol de diferentes categorias. 2009.

CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE FUTEBOL – CBF. Disponível em: www.cbf.com.br
Acesso em 13 nov. 2015.

CONTI, Juliana et al. Diversity of approaches in assessment of executive functions in stroke: Limited evidence?. **eNeurologicalSci**, v. 1, n. 1, p. 12-20, 2015.

COSTA, Leonardo Oliveira Pena; SAMULSKI, Dietmar Martin. Processo de validação do questionário de estresse e recuperação para atletas (RESTQ-Sport) na língua portuguesa. **CEP**, v. 31310, p. 250, 2005.

COUTTS, A. J.; WALLACE, L. K.; SLATTERY, K. M. Monitoring changes in performance, physiology, biochemistry, and psychology during overreaching and recovery in triathletes. **International journal of sports medicine**, v. 28, n. 2, p. 125-134, 2007

COUNT, FIFA Big. 270 million people active in football. **FIFA Communications Division, Information Services**, v. 31, p. 2007, 2006

CREWETHER, Blair et al. The salivary testosterone and cortisol response to three loading schemes. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 22, n. 1, p. 250-255, 2008.

CUEVAS-CÓRDOBA, Betzaida; SANTIAGO-GARCIA, Juan. Saliva: A fluid of study for OMICS. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 18, n. 2, p. 87-97, 2014

CUNHA, Giovani dos Santos; RIBEIRO, Jerri Luiz; OLIVEIRA, Álvaro Reischak de. Níveis de beta-endorfina em resposta ao exercício e no sobretreinamento. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia. São Paulo. Vol. 52, n. 4, p. 589-598**, 2006.

CZERMAINSKI, Fernanda Rasch; BOSA, Cleonice Alves; DE SALLES, Jerusa Fumagalli. Funções Executivas em Crianças e Adolescentes com Transtorno do Espectro do Autismo: Uma Revisão. **Psico**, v. 44, n. 4, p. 518-525, 2014.

DARDIOTIS, Efthimios et al. Cognitive impairment in heart failure. **Cardiology research and practice**, v. 2012, 2012.

DAWSON, B.; FITZSIMONS, M.; WARD, D. The relationship of repeated sprint ability to aerobic power and performance measures of anaerobic work capacity and power. **Australian Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 25, p. 88-88, 1993.

DENNISS, Alan Robert; YOUNG, John Atherton. Modification of salivary duct electrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin, VIP, GIP and other enterohormones. **Pflügers Archiv**, v. 376, n. 1, p. 73-80, 1978.

DENNY, Paul et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 5, p. 1994-2006, 2008.

DEMINICE, R. et al. Blood and salivary oxidative stress biomarkers following an acute session of resistance exercise in humans. **International journal of sports medicine**, v. 31, n. 9, p. 599, 2010.

DE OLIVEIRA, V. N. et al. Changes in the salivary biomarkers induced by an effort test. **Int J Sports Med**, v. 31, n. 6, p. 377-81, 2010.

- EDWARDS, A. M.; CLARK, N.; MACFADYEN, A. M. Lactate and ventilatory thresholds reflect the training status of professional soccer players where maximum aerobic power is unchanged. **Journal of sports science & medicine**, v. 2, n. 1, p. 23, 2003.
- EKBLOM, Björn. Applied physiology of soccer. **Sports medicine**, v. 3, n. 1, p. 50-60, 1986.
- ELIAS, Norbert. **O Processo Civilizador 2: formação do Estado e civilização**. Zahar, 1992.
- FABRE, Bibiana et al. Measurement of fasting salivary insulin and its relationship with serum insulin in children. **Endocrine Connections**, v. 1, n. 2, p. 58-61, 2012.
- FAISS, Raphael et al. Significant molecular and systemic adaptations after repeated sprint training in hypoxia. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56522, 2013.
- FOX, P. C. Saliva composition and its importance in dental health. **Compendium (Newtown, Pa.). Supplement**, n. 13, p. S457, 1989.
- FRY, A. C.; KRAEMER, W. J.; RAMSEY, L. T. Pituitary-adrenal-gonadal responses to high-intensity resistance exercise overtraining. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 6, p. 2352-2359, 1998.
- GARRETT, William E.; KIRKENDALL, Donald T. **A ciência do exercício e dos esportes**. Artmed, 2003.
- GATTI, R.; DE PALO, E. F. An update: salivary hormones and physical exercise. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 21, n. 2, p. 157-169, 2011.
- GLEESON, MAREE et al. Salivary IgA levels and infection risk in elite swimmers. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, p. 67-73, 1999.
- GLEESON, Maree; PYNE, David B. Exercise effects on mucosal immunity. **Immunology and cell biology**, v. 78, n. 5, p. 536-544, 2000.
- GOEL, Vinod; PULLARA, S. David; GRAFMAN, Jordan. A computational model of frontal lobe dysfunction: Working memory and the Tower of Hanoi task. **Cognitive Science**, v. 25, n. 2, p. 287-313, 2001.
- GOMEZ-CABRERA, Mari-Carmen et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **The Journal of physiology**, v. 567, n. 1, p. 113-120, 2005.
- GOMES, Antonio Carlos. **Treinamento Desportivo: Estruturação e Periodização**. Artmed, 2009.
- GONZÁLEZ, David et al. Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. **Research in Sports Medicine**, v. 16, n. 2, p. 128-137, 2008.
- GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J., DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, p. 751-766, 1949.
- GRANELL, J. C.; CERVERA, Victor Ramon. Teoria e planejamento do treinamento desportivo. **Porto Alegre: Artmed**, 2003.

GREABU, Maria et al. Saliva—a diagnostic window to the body, both in health and in disease. **J Med Life**, v. 2, n. 2, p. 124-132, 2009.

HANDZISKI, Z. et al. The changes of ACTH, cortisol, testosterone and testosterone/cortisol ratio in professional soccer players during a competition half-season. **Bratislavské lekárske listy**, v. 107, n. 6/7, p. 259, 2006.

HAECKEL, Rainer; HANECKE, Petra. Application of saliva for drug monitoring an in vivo model for transmembrane transport. **European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 171-192, 1996.

HANSEN, John, David LAMBERT, and Terezinha OPPIDO. "Anatomia clínica de NETTER." *Porto Alegre: Artmed* (2007).

HE, Cheng-Shiun et al. Relationships among salivary immunoglobulin A, lactoferrin and cortisol in basketball players during a basketball season. **European journal of applied physiology**, v. 110, n. 5, p. 989-995, 2010.

HELMERHORST, E. J.; OPPENHEIM, F. G. Saliva: a dynamic proteome. **Journal of dental research**, v. 86, n. 8, p. 680-693, 2007.

HOOGEVEEN, A. R.; ZONDERLAND, M. L. Relationships between testosterone, cortisol and performance in professional cyclists. **International journal of sports medicine**, v. 17, n. 6, p. 423-428, 1996.

HORGAN, Richard P.; KENNY, Louise C. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. **The Obstetrician & Gynaecologist**

HUMPHREY, Sue P.; WILLIAMSON, Russell T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162-169, 2000

JOHNSON, Leonard R.; GERWIN, Thomas A. (Ed.). **Gastrointestinal physiology**. London: Mosby Elsevier, 2007.

JONES, Rhys M. et al. Relationship between repeated sprint ability and aerobic capacity in professional soccer Players. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

KAUFMAN, Eliaz; LAMSTER, Ira B. The diagnostic applications of saliva—a review. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 197-212, 2002.

KELES, M. S. et al. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. **The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques**, v. 28, n. 2, p. 141-143, 2001.

KELLMANN, Michael; KALLUS, Konrad Wolfgang. **Recovery-stress questionnaire for athletes: user manual**. Human Kinetics, 2001.

KIDD, Parris M. et al. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Altern Med Rev**, v. 2, n. 3, p. 155-176, 1997.

KIM, Jeansok J.; DIAMOND, David M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 453-462, 2002.

KIRSCHBAUM, Clemens et al. Noise and stress-salivary cortisol as a non-invasive measure of allostatic load. **Noise and Health**, v. 1, n. 4, p. 57, 1999.

- KIVLIGHAN, Katie T. et al. Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. **Hormones and Behavior**, v. 46, n. 1, p. 39-46, 2004.
- KRAUS, Frederick W.; PERRY, William I.; NICKERSON, John F. Salivary catalase and peroxidase values in normal subjects and in persons with periodontal disease. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 11, n. 1, p. 95-102, 1958.
- KRUSTRUP, Peter et al. Muscle and blood metabolites during a soccer game: implications for sprint performance. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 38, n. 6, p. 1165-1174, 2006.
- KUZKAYA, Nermin et al. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 343-354, 2005.
- LAING, S. J. et al. Salivary IgA response to prolonged exercise in a hot environment in trained cyclists. **European journal of applied physiology**, v. 93, n. 5-6, p. 665-671, 2005.
- LEHMANN, MANFRED et al. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 30, n. 7, p. 1140-1145, 1998.
- LIMA, Daniela Pereira et al. Saliva: reflection of the body. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. e184-e188, 2010.
- LIPPI, Giuseppe et al. Measurement of morning saliva cortisol in athletes. **Clinical biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 904-906, 2009
- LLENA PUY, Carmen. La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)**, v. 11, n. 5, p. 449-455, 2006.
- LOO, J. A. et al. Comparative human salivary and plasma proteomes. **Journal of dental research**, v. 89, n. 10, p. 1016-1023, 2010.
- LOMBARDI, Giovanni et al. Serum uric acid in top-level alpine skiers over four consecutive competitive seasons. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 9, p. 645-648, 2010.
- MACKINNON, LAUREL TRAEGER et al. Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in elite swimmers. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 29, n. 12, p. 1637-1645, 1997.
- MALAMUD, Daniel. Saliva as a diagnostic fluid. **BMJ**, v. 305, n. 6847, p. 207-208, 1992.
- MALAMUD, Daniel. Saliva as a diagnostic fluid. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 159-178, 2011.
- MALM, Christer. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 16, n. 1, p. 4-6, 2006.
- MANDEL, Irwin D. Nonimmunologic aspects of caries resistance. **Journal of dental research**, v. 55, p. C22-31, 1976.
- MANDEL, Irwin D. The diagnostic uses of saliva. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 19, n. 3, p. 119-125, 1990.

MANNING, Melvin R.; LEVY, Richard S. Soccer. **Physical medicine and rehabilitation clinics of North America**, v. 17, n. 3, p. 677-695, 2006.

MANNRICH, Giuliano. Perfil dos marcadores bioquímicos de lesões músculo esquelética, relacionado ao estudo psicológico, em atletas profissionais de futebol. **Perfil dos marcadores bioquímicos de lesões músculo esquelética, relacionado ao estado psicológico, em atletas profissionais de futebol**, 2007.

MARGONIS, Konstantinos et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 6, p. 901-910, 2007.

MARTIN, Valéria. **Futebol: lactato e amonia sanguíneos em teste de velocidade supra-máxima**. 2002. Tese de Doutorado.

MASO, F. et al. Salivary testosterone and cortisol in rugby players: correlation with psychological overtraining items. **British Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 3, p. 260-263, 2004.

MCEWEN, Bruce S. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, n. 1, p. 1-7, 2004.

MCGUIGAN, Michael R.; EGAN, Alison D.; FOSTER, Carl. Salivary cortisol responses and perceived exertion during high intensity and low intensity bouts of resistance exercise. **Journal of sports science & medicine**, v. 3, n. 1, p. 8, 2004.

MEEUSEN, Romain et al. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome: ECSS Position Statement 'Task Force'. **European Journal of Sport Science**, v. 6, n. 01, p. 1-14, 2006.

MEMMERT, Daniel. Creativity, expertise, and attention: Exploring their development and their relationships. **Journal of sports sciences**, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2011.

MENDEZ, J.; FRANKLIN, B.; KOLLIAS, J. Relationship of blood and saliva lactate and pyruvate concentrations. **Biomedicine/[publiee pour l'AAICIG]**, v. 25, n. 9, p. 313-314, 1976.

MILLER, S. M. Saliva testing--a nontraditional diagnostic tool. **Clinical laboratory science: journal of the American Society for Medical Technology**, v. 7, n. 1, p. 39-44, 1993.

MIZOGUCHI, Kazushige et al. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 1568-1574, 2000.

MOHR, Magni; KRUSTRUP, Peter; BANGSBO, Jens. Match performance of high-standard soccer players with special reference to development of fatigue. **Journal of sports sciences**, v. 21, n. 7, p. 519-528, 2003.

MOORE, Suzanne et al. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. **Free radical research**, v. 21, n. 6, p. 417-425, 1994. MOREIRA, Alexandre et al. Salivary cortisol in top-level professional soccer players. **European journal of applied physiology**, v. 106, n. 1, p. 25-30, 2009

NAVAZESH, Mahvash. Methods for collecting saliva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 694, n. 1, p. 72-77, 1993.

NAVAZESH, Mahvash; KUMAR, Satish KS. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, p. 35S-40S, 2008.

NEGRONI, Marta. **Microbiología estomatológica**. Ed. Médica Panamericana, 2000

NIEMAN, David C. Exercise, infection, and immunity. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15, n. 3, p. S131, 1994.

NIEMAN, David C. Is infection risk linked to exercise workload?. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, n. 7 Suppl, p. S406-11, 2000.

NIEMAN, D. C. et al. Change in salivary IgA following a competitive marathon race. **International journal of sports medicine**, v. 23, n. 1, p. 69-75, 2002.

NIEUW AMERONGEN, A. R. I. E.; LIGTENBERG, Antoon JM; VEERMAN, Enno CI. Implications for diagnostics in the biochemistry and physiology of saliva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, n. 1, p. 1-6, 2007.

NUNES, Lázaro Alessandro Soares; MACEDO, Denise Vaz de. Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: potential and limitations. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 4, p. 247-255, 2013.

OBERG, STEPHEN G.; IZUTSU, KENNETH T.; TRUELOVE, EDMOND L. Human parotid saliva protein composition: dependence on physiological factors. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 242, n. 3, p. G231-G236, 1982.

OHKUWA, T. et al. Salivary and blood lactate after supramaximal exercise in sprinters and long-distance runners. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 5, n. 5, p. 285-290, 1995.

OPPENHEIM, Frank G. et al. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, n. 1, p. 22-50, 2007.

PEDERSEN, BENTE KLARLUND; ULLUM, HENRIK. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 26, n. 2, p. 140-146, 1994.

PEÑAILILLO, Luis et al. Salivary hormones and IgA in relation to physical performance in football. **Journal of sports sciences**, p. 1-8, 2015.

PENNINGTON, Bruce F.; OZONOFF, Sally. Executive functions and developmental psychopathology. **Journal of child psychology and psychiatry**, v. 37, n. 1, p. 51-87, 1996.

PFAFFE, Tina et al. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. **Clinical chemistry**, v. 57, n. 5, p. 675-687, 2011.

POWELL, Jeffrey et al. Salivary and serum cortisol levels during recovery from intense exercise and prolonged, moderate exercise. **Biol Sport**, v. 32, n. 2, p. 91-95, 2015.

POWERS, Scott K.; JACKSON, Malcolm J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.

RAMOS-FILHO, Dionizio et al. High intensity interval training (HIIT) induces specific changes in respiration and electron leakage in the mitochondria of different rat skeletal muscles. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0131766, 2015.

REILLY, THOMAS; THOMAS, V. A motion analysis of work-rate in different positional roles in professional football match-play. **Journal of human movement studies**, v. 2, n. 2, p. 87-97, 1976.

RUDNEY, J. D.; SMITH, Q. T. Relationships between levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase, and secretory immunoglobulin A in stimulated parotid saliva. **Infection and immunity**, v. 49, n. 3, p. 469-475, 1985.

RYU, Kwangmin et al. Comparison of athletes with and without burnout using the stroop color and word test. **Perceptual & Motor Skills**, v. 121, n. 2, p. 413-430, 2015.

SAMULSKI, Dietmar. **Psicologia do esporte: conceitos e novas perspectivas**. Manole, 2009.

SAHEBJAMEE, Mahnaz et al. Salivary concentration of TNF alpha, IL1 alpha, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 13, n. 5, p. 292, 2008.

SANTOS, R. V. T. et al. Effects of a 30-km race upon salivary lactate correlation with blood lactate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 145, n. 1, p. 114-117, 2006.

SARI-SARRAF, V.; REILLY, T.; DORAN, D. A. Salivary IgA response to intermittent and continuous exercise. **International Journal of sports medicine**, v. 27, n. 11, p. 849-855, 2006.

SCHNEYER, L. H. Sympathetic control of Na, K transport in perfused submaxillary main duct of rat. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 230, n. 2, p. 341-345, 1976.

SCHWARTZ, Eve B.; GRANGER, Douglas A. Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 654-656, 2004.

SELYE, Hans. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **The American journal of medicine**, v. 10, n. 5, p. 549-555, 1951.

SHAH, Franky D. et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 326-334, 2011.

SHIMADA, Maurício Hidemi et al. Emprego de saliva na determinação do risco às doenças periodontais: aspectos microbiológicos e clínicos. **Rev Odontol UNESP**, v. 37, p. 183-9, 2008.

SHIMIZU, Kazuhiro et al. Effects of exercise, age and gender on salivary secretory immunoglobulin A in elderly individuals. **Exerc Immunol Rev**, v. 13, n. 55-66, 2007.

SILVA, Rafael Pires da et al. Imunoglobulina A salivar (IgA-s) e exercício: relevância do controle em atletas e implicações metodológicas. **Rev. bras. med. esporte**, v. 15, n. 6, p. 459-466, 2009.

SILVA, Juliano Fernandes da et al. Relação entre aptidão aeróbia e capacidade de sprints repetidos no futebol: efeito do protocolo. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 13, n. 2, p. 111-6, 2011.

SMITH, LUCILLE LAKIER. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress?. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, n. 2, p. 317-331, 2000.

SOUSA, Nuno; ALMEIDA, Osborne FX. Corticosteroids: sculptors of the hippocampal formation. **Reviews in the neurosciences**, v. 13, n. 1, p. 59-84, 2002.

SOUZA, Angela C.; MAMIYA, Edgar N.; ZOUAIN, Nestor. Three-dimensional model for solids undergoing stress-induced phase transformations. **European Journal of Mechanics-A/Solids**, v. 17, n. 5, p. 789-806, 1998.

SPIELMANN, Nadine; WONG, David T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral diseases**, v. 17, n. 4, p. 345-354, 2011.

STAINSBY, WENDELL N.; BROOKS, George A. Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 18, n. 1, p. 29-64, 1990.

STAWSKI, Robert S. et al. Associations between cognitive function and naturally occurring daily cortisol during middle adulthood: timing is everything. **The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences**, v. 66, n. suppl 1, p. i71-i81, 2011.

STØLEN, Tomas et al. Physiology of soccer. **Sports medicine**, v. 35, n. 6, p. 501-536, 2005.

STUPNICKI, R.; OBMINSKI, Z. Glucocorticoid response to exercise as measured by serum and salivary cortisol. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 65, n. 6, p. 546-549, 1992.

STROOP, J. Ridley. Studies of interference in serial verbal reactions. **Journal of experimental psychology**, v. 18, n. 6, p. 643, 1935.

TANSKANEN, Minna; ATALAY, Mustafa; UUSITALO, Arja. Altered oxidative stress in overtrained athletes. **Journal of sports sciences**, v. 28, n. 3, p. 309-317, 2010.

TÉKUS, Éva et al. Comparison of blood and saliva lactate level after maximum intensity exercise. **Acta Biologica Hungarica**, v. 63, n. Supplement 1, p. 89-98, 2012.

TIETZE, Frank. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.

TIWARI, Manjul. Science behind human saliva. **Journal of natural science, biology, and medicine**, v. 2, n. 1, p. 53, 2011.

THOMAS, Non Eleri et al. The effect of anaerobic exercise on salivary cortisol, testosterone and immunoglobulin (A) in boys aged 15–16 years. **European journal of applied physiology**, v. 107, n. 4, p. 455-461, 2009.

- TSUBER, Viktoriia; KADAMOV, Yunus; TARASENKO, Lydia. Activation of Antioxidant Defenses in Whole Saliva by Psychosocial Stress Is More Manifested in Young Women than in Young Men. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e115048, 2014.
- TUMILTY, D. M. et al. Is" lactic acid tolerance" an important component of fitness for soccer. **Science and football. Spon, London**, p. 81-86, 1988.
- TUBINO, Manuel José Gomes. **Metodologia científica do treinamento desportivo**. 2003.
- VERBURGH, Lot et al. Executive functioning in highly talented soccer players. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91254, 2014.
- VERKMAN, A. S. Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 9, n. 5, p. 517-522, 2000.
- VESTBERG, Torbjörn et al. Executive functions predict the success of top-soccer players. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34731, 2012.
- WADLEY, Glenn; LE ROSSIGNOL, Peter. The relationship between repeated sprint ability and the aerobic and anaerobic energy systems. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 1, n. 2, p. 100-110, 1998.
- WAGNER, Shannon L. et al. Higher cortisol is associated with poorer executive functioning in preschool children: The role of parenting stress, parent coping and quality of daycare. **Child Neuropsychology**, p. 1-17, 2015.
- WANG, Jessica et al. Salivary Biomarkers of oxidative stress: A critical review. **Free Radical Biology and Medicine**, 2015.
- WARD, Paul et al. Perceptual and cognitive skill development in soccer: The multidimensional nature of expert performance. **Journal of sport and exercise psychology**, v. 25, n. 1, p. 93-111, 2003.
- WILLIAMS, A. Mark; ERICSSON, K. Anders. Perceptual-cognitive expertise in sport: Some considerations when applying the expert performance approach. **Human movement science**, v. 24, n. 3, p. 283-307, 2005.
- WITHERS, R. T. et al. Match analysis of Australian professional soccer players. **J Hum Mov Stud**, v. 8, p. 159-176, 1982.
- WISLOEFF, ULRİK; HELGERUD, J.; HOFF, J. Strength and endurance of elite soccer players. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 30, p. 462-467, 1998.
- WONG, David T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. **The Journal of the American Dental Association**, v. 137, n. 3, p. 313-321, 2006.
- WONG, David T. Salivary Diagnostics Amazing as it might seem, doctors can detect and monitor diseases using molecules found in a sample of spit. **Am Sci**, v. 96, n. 1, p. 37-43, 2008.
- WRAGG, C. B.; MAXWELL, N. S.; DOUST, J. H. Evaluation of the reliability and validity of a soccer-specific field test of repeated sprint ability. **European Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 1, p. 77-83, 2000.
- YAN, Weihong et al. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. **Proteomics-Clinical Applications**, v. 3, n. 1, p. 116-134, 2009.

ZAGATTO, Alessandro Moura et al. Comparação entre a utilização de saliva e sangue para determinação do lactato mínimo em cicloergômetro e ergômetro de braço em mesatenistas. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 6, p. 475-480, 2004.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHANG, Lei et al. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 19, p. 3341-3350, 2012.

ZIMMERMANN, Bernhard G.; PARK, Noh Jin; WONG, David T. Genomic targets in saliva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, n. 1, p. 184-191, 2007.

APÊNDICE - Formato final do 1º artigo científico submetido***Title page (including all author details and affiliations)****Title page****Salivary biochemical evaluation in professional soccer players after repeated sprint ability test.**

Vinicius Rodrigues-de-Araujo ^a, Patricia C. Lisboa ^b, Fabiele A.H. Caraméz ^a, Luciane Pires ^a, Dionizio Ramos-Filho ^a, Gabriel Boaventura ^a, Elaine Oliveira ^b, Egberto G. Moura ^b, Gustavo Casimiro-Lopes ^a✉

^a Laboratory of Exercise Pathophysiology, Department of Gymnastics, Physical Education and Sports Institute, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratory of Endocrine Physiology, Department of Physiological Sciences, Biology Institute, Rio de Janeiro State University, Rio De Janeiro, RJ, Brazil

✉Corresponding author

Prof. Gustavo Casimiro Lopes

Rio de Janeiro State University

Rua São Francisco Xavier, 524 – bloco F sala 9110 – Rio de Janeiro, Brazil.

CEP: 20.550-900

Phone: (55021) 2334-1028

e-mail: profcasimiro@uerj.br

Word Count: 2.453 - Abstract word count: 242

Number of Tables: 2 – Number of Figures: 1

*Manuscript (excluding all author details and affiliations)
[Click here to view linked References](#)

1

1 **Abstracts**

2 *Objectives:* To evaluate intensity of exercise, oral mucosal immunity, redox homeostasis
3 parameters in saliva of athletes subjected to an acute high intensity intermittent exercise
4 protocol.

5 *Design:* Cross sectional study

6 *Methods:* Thirty-two professional soccer athletes (age $21.2 \pm 4.2y$) were subjected to
7 repeated sprint ability (RSA) test. Saliva aliquots were collected at rest and immediately after
8 RSA test.

9 *Results:* Lactate levels in saliva was increased when compared with pretest values (6.95
10 fold-increase; $p<0.05$). Total salivary protein followed a similar pattern with increased levels
11 observed after RSA test (44%; $p<0.05$). Salivary immunoglobulin-A (slg-A) levels did not
12 show any significant differences after RSA test. Cortisol levels in saliva was increased after
13 RSA test (34%; $p<0.05$) when compared with rest values. Redox homeostasis parameters in
14 saliva showed heterogeneous pattern after RSA test. GSH and TBARs levels did not show
15 any significant differences, while uric acid levels in saliva was decreased after RSA test (-
16 26%; $p<0.05$). Interestingly, salivary SOD was increased (3.63 fold-increase; $p<0.05$) while
17 CAT levels in saliva did not achieve significant differences. In conclusion, RSA tests could be
18 conducted in soccer athletes.

19 *Conclusions:* Salivary cortisol evaluation could allow load parameters monitoring during
20 exercise and unaltered slg-A levels suggests the absence of deleterious effects in oral
21 mucosal immunity. Additionally, uric acid could be a key factor for TBARs maintenance
22 during acute high-intensity intermittent protocol. Interestingly, increased levels of SOD in
23 saliva seem to act as a second-line defense mechanism against exercise-induced ROS/
24 RNS production after exercise.

25

26 **Keywords:** Saliva, Biochemical Markers, Soccer Players, Sprint Test, Exercise

27

28 1. Introduction

29 Many team-sports present periods of short-duration sprints interspersed with brief
30 recoveries, which have been termed repeated-sprint ability or RSA.^[1] This ability is defined
31 as an important feature for high-level athletic performance and could be a determinant factor
32 in match outcome. Team-sports like soccer impose great physiological demands to the body,
33 since it involves many periods of high intensity and short duration sprints during the game.
34 The study of Mohr et al.,^[2] observed that during a match elite soccer players could execute
35 150-250 bouts of high intensity actions lasting 1.9 to 2.7 seconds each. Accounting for
36 covered distances 49% of these actions were shorter than 10 meters and 96% were shorter
37 than 30 meters.

38 From a biochemical point of view, energy sources during RSA must come basically
39 from muscle phosphocreatine and ATP hydrolysis, however anaerobic glycolysis is also
40 involved since high levels of blood lactate are observed in this type of training.^[3]

41 In this context biochemical monitoring is of paramount importance in high level sports
42 to evaluate many factors related with exercise prescription, training program design and
43 fatigue monitoring.^[3]

44 Unfortunately, blood collection has some features that are necessary for successful
45 results, like adequate equipment and specialized personnel. Besides, Koka et al. observed in
46 general population that for research and clinical purposes subjects regarded saliva donation
47 as more comfortable and convenient than blood or urine, a feature that possibly could also
48 be true for athletes.^[4] As a non-invasive and stress free alternative to blood, saliva is a
49 growing trend that can be confirmed in numerous publications as a source of hormones,
50 enzymes and many other parameters.^[5] Indeed, saliva is becoming increasingly studied for
51 disease diagnostics systemic diseases like diabetes.^[6] However, few studies have proposed
52 the use of salivary biomarkers and its influence in team-sports performance athletes. So the
53 aim of this study was to evaluate acute salivary biochemical responses in soccer athletes
54 subjected to an RSA test protocol.

55

56 2. Methods

57 Thirty-two professional soccer athletes (mean \pm SD: age 21.2 ± 4.2 years; height 1.77
58 ± 0.07 m; body mass 74.8 ± 10.1 kg; BMI 23.8 ± 2.9 Kg/m²) were enrolled during the study.
59 All the voluntaries were part of a physical training center for soccer players named CETRAF
60 (Rio de Janeiro, Brazil). The Ethics Committee of Rio de Janeiro State University approved
61 the study (ID: 30711414.8.0000.5259). Informed consent was obtained from all participants
62 before testing. Participants presenting one or more of the following criteria were excluded
63 from the study: smoking, suffering from any known chronic disease, use of any medication or
64 dietary supplements.

65 Participants were requested to abstain from alcohol, caffeine and strenuous exercise
66 prior to the trial. Participants arrived at 8:30 a.m. for the main trial and were required to sit
67 quietly for 5 min before providing saliva samples representing rest conditions. A final saliva
68 sample was obtained immediately after completing repeated ability test described below.

69 Repeated Sprint Ability test (RSA) is also known as Bangsbo Sprint Test and was
70 performed as described elsewhere. The players must perform seven successive 40 meters
71 sprints with direction changes. The sprints were separated by 25 seconds of active recovery
72 which consisted of light jogging to starting point. Photoelectric cells (Hidrofit®, Belo
73 Horizonte- MG, Brazil) were used to measure the subjects sprint time and to increase test
74 reliability. Failed attempts during RSA tests due to falls or slips were excluded and when
75 observed in the first bout the test was stopped with later restart after full athlete recovery. In
76 the case of errors during final sprints the performance indexes would be calculated using the
77 fifth and the sixth sprints. This is a static protocol test, so we did not measure physical
78 performance directly, since our main interest was to evaluate the salivary biochemical
79 responses after a physical test.

80 Samples were collected in the morning (9.00–12.00 a.m.). Athletes have been
81 instructed not to eat and drink, except (non-carbonated) mineral water two hours before

82 sampling. Before the collection of saliva, all athletes drank 300 ml water. Whole saliva
83 samples were collected into Eppendorf tubes before (Pre) and immediately after (Post) the
84 exercise tests without any chemical stimulation. Salivary samples were centrifuged at 10.000
85 rpm for 10 min at 4°C to remove cell debris. The resulting supernatant was stored at -20 °C
86 until analysis.

87 We evaluated salivary transferrin as a sign of blood contamination in all samples with
88 commercial kit (Salimetrics™). The limit of sensitivity was 0.08 mg/dl, and average intra and
89 interassay coefficients of variation was less than 10% and 15%, respectively.

90 Lactate was measured using a commercial kit (Bioclin™, Minas Gerais, Brazil).
91 Briefly, 10 µl of saliva was mixed with 1.0 ml of buffer containing lactate dehydrogenase and
92 β-Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). The reaction was incubated for 5 min at 37°C
93 and read at 340 nm. The blanks contained 10 µl of water and 1.0 ml buffer. The standard
94 curve was constructed using the kit reagents. Total protein concentration was determined
95 using the Biuret method, using bovine serum albumin (BSA) as a standard with a commercial
96 kit (Bioclin™, Minas Gerais, Brazil). The results are express in g/dL. Cortisol was determined
97 by expanded range enzyme immunoassay using commercially available cortisol kits
98 (Diametra™, Foligno, Italy). Cortisol sensitivity was 0.007 ng.mL⁻¹ with respective intra- and
99 interassay coefficients of variation of 3.1% and 9.8%. The results were expressed in ng/mL.
100 Salivary immunoglobulin-A (sIg-A) was assayed using commercially available enzyme-linked
101 immunosorbent assays (Salimetrics™, Palo Alto, USA).

102 The enzymatic activity of the superoxide dismutase (SOD) was determined by the
103 inhibition of autoxidation of adrenaline measured spectrophotometrically (480nm) as
104 described by Bannister and Calabrese.^[7] Catalase (CAT) activity was determined at 25°C
105 according to Aebi.^[8] The reaction mixture contained 30 mM H₂O₂ in a 50 mM phosphate
106 buffer pH 7.0, and 0.1 ml enzyme in a total volume of 3 ml. CAT activity was estimated by
107 decreased in absorbance of H₂O₂ at 240 nm. Glutathione (GSH) was assayed in 100 µL of

108 saliva pipetted into Eppendorf tubes containing 200 μ L of trichloroacetic acid (TCA) 10%
109 solution that was mixed and centrifuged at 4,000 x g for 10 min at 16°C. To 200 μ L of the
110 supernatant 700 μ L of 400 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride (Tris-HCl)
111 buffer, pH 8.9, was added followed by the addition of 100 μ L of 2.5 mM 5,5'-dithiobis-2-
112 nitrobenzoic acid (DTNB) dissolved in 40 mM Tris-HCl buffer pH 8.9. After 10 min at room
113 temperature the extinction of the samples was measured at 412 nm in (BioChrom™, EZ
114 READ 400, Cambridge, England). Blank consisted of DTNB instead of sample; its extinction
115 was subtracted from the test sample extinction before matching it with the standard curve
116 (50-1000 μ M). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) were assayed with 100 μ L of
117 saliva mixed with 500 μ L TCA 35% and 500 μ L Tris-HCl (200 mM, pH 7.4) and incubated for
118 10 min at room temperature. One milliliter of 2 M Na₂SO₄ and 55 mM thiobarbituric acid
119 solution was added and the samples were incubated at 95°C for 45 min. The samples cooled
120 on ice for 5 min and mixed after the addition of 1 ml TCA 70%. Finally, the samples were
121 centrifuged at 15,000g for 3 min and the absorbance of the supernatant was read at 530 nm.
122 A molar extinction coefficient was used ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the results were
123 expressed as nmol TBARs/mL. Uric acid concentration was determined by colorimetric assay
124 (Bioclin™; Minas Gerais, Brazil). Results were expressed in mg/dL.

125 Differences in individual sprints of RSA were assessed using repeated measures
126 one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test. Differences in salivary analysis
127 between the Pre and Post were assessed using Student's paired *t*-tests. Data in text and
128 figures are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All
129 statistical analyses were performed with GraphPad Prism Software (GraphPad Prism version
130 5.03 for Windows; GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

131 3. Results

132 During RSA test the athletes developed higher sprint times at fourth bout (3%;
133 $p < 0.05$), which was not compensated until the end of the test suggesting the exhaustive
134 characteristic of RSA test (Table 1).

135 All the samples achieved values of salivary transferrin below the threshold limit for
136 blood contamination of 5 mg/ L. Lactate levels in saliva was increased when compared with
137 pretest values (6.95 fold; $p < 0.05$). Total salivary protein followed a similar pattern with
138 increased levels observed after RSA test (44%; $p < 0.05$). Salivary immunoglobulin-A (sIg-A)
139 levels did not show any significant differences after RSA test in soccer athletes. Cortisol
140 levels in saliva was increased after RSA test (34%; $p < 0.05$) when compared with rest values,
141 as shown in (Table 2).

142 Redox homeostasis parameters in saliva showed heterogeneous pattern after RSA
143 test. GSH and TBARs levels did not show any significant differences, while uric acid levels in
144 saliva was decreased after RSA test (-26%; $p < 0.05$). However salivary SOD was increased
145 (3.63 fold; $p < 0.05$) while CAT in saliva did not achieve significant differences (Fig 1).

146

147 4. Discussion

148 RSA test produced progressive fatigue in soccer athletes, as showed by increasingly
149 sprint times that attained significance at fourth bout.

150 Blood contamination could cause interference during salivary parameters
151 quantification as observed for salivary cortisol.^[8] However our results did not achieve the
152 values that could induce analytical errors in the biochemical parameters as described by
153 Schwartz e Granger.^[10]

154 Salivary protein was increased after the exercise bout that is related to exercise
155 intensity.^[11] Additionally, salivary lactate followed the same pattern, which is also suggestive
156 of greater anaerobic metabolism participation, with a similar pattern reported for blood lactate
157 levels.^[12] In fact RSA involves mainly anaerobic energy production that produces high levels
158 of blood lactate as a consequence.^[13] Interestingly, maximal oxygen consumption (VO_{2max})

159 seems to be inversely associated with RSA suggesting that aerobic capacity could have a
160 major role during recovery to allow adequate energy substrate replenishment.^[14] Indeed,
161 specific adaptations at the skeletal muscle level in humans seem to be determinant for high
162 intensity performance.^[15] Experimental studies showed that rats subjected to high intensity
163 interval training, present mitochondrial adaptations in skeletal muscles favoring an oxidative
164 phenotype.^[16] These results suggest that high intensity intermittent tests similar to the current
165 protocol used in this study could also offer interesting possibilities to mixed metabolic
166 pathways during physical training in team-sports athletes.

167 Salivary Ig-A (sIg-A) can be considered the main immunological barrier in oral
168 cavity.^[17] Besides, the effects of physical exercise on sIg-A seems to be related to intensity
169 and/or duration parameters. Moderate intensity training exerts stimulatory effects on sIg-A
170 levels, while high intensity exercise or endurance exercise is related to acute immune
171 suppression, which is also linked with upper respiratory tract infections.^[18] Our results
172 showed that RSA test did not alter sIg-A levels, a feature that could be related with the
173 intermittent characteristics of the chosen protocol as observed previously by Thomas et al.^[19]

174 Increased levels of cortisol in saliva, also indicates a stimulatory effect of RSA test
175 upon hypothalamic-pituitary adrenal axis. Cortisol secretion seems to be directly stimulated
176 by exercise intensity, however many training coaches links its increases with performances
177 decrements, probably due to its catabolic effects.^[20] Indeed, training sessions using
178 resistance exercises protocols with higher number of sets and repetitions induced higher
179 salivary cortisol levels, when compared with low volume training sessions, which suggests
180 that cumulative work associated with short rest intervals is more relevant to cortisol
181 production than exercise intensity alone.^[21] In fact, cortisol secretion was more pronounced
182 during training programs whose objectives were related towards muscle hypertrophy.^[21]

183 Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/ RNS) production can be evaluated
184 through some biochemical parameters like specific antioxidants or by its damage in specific
185 targets like cell membranes and proteins.^[22]

186 Salivary redox markers seem to be differentially affected by physical exercise in
187 comparison with blood. To our knowledge, few studies evaluated the effect of physical
188 exercise upon redox homeostasis in adult athletes. González et al., reported increased uric
189 acid levels with decreased lipid hydroperoxides in saliva after a 10,000-m race.^[23]
190 Interestingly, Deminice et al. observed a significant increase in uric acid concentration with
191 unaltered TBARs levels after a resistance training protocol.^[24] These studies suggest that
192 salivary redox homeostasis could be related to specific training demands; however other
193 factors could also be involved. Our results showed that antioxidant parameters seem to be
194 differentially regulated in response to RSA test in soccer players without deleterious signs of
195 oxidative stress.

196 Salivary TBARs were not affected by acute RSA test in this study; interestingly uric
197 acid was lower while GSH levels did not show any significant differences. Data regarding
198 GSH responses to exercise in saliva are scarce. GSH antioxidant action is related to its
199 electron and sulfhydryl (-SH) donation properties.^[25] Our results did not show any significant
200 alteration in GSH after RSA test, which corroborates with previous findings.^[24] Since uric acid
201 accounts for up to 70% of saliva antioxidant capacity it is normally described as the main
202 antioxidant in this fluid.^[26] So, the decrement observed in this study could explain why we did
203 not observed exercise-induced lipid peroxidation.

204 Salivary CAT evaluation was initially performed by Kraus et al.,^[27] but studies
205 regarding the influence of physical exercise are still lacking. Tsuber et al. observed
206 stimulatory effects after psychosocial stress.^[28] In our study CAT levels were not significantly
207 affected by physical exercise. Besides salivary SOD concentrations were higher probably
208 due to increased ROS/ RNS production after physical exercise.^[29] These specific responses
209 in salivary antioxidant enzymes could also suggest different patterns for exercise-induced
210 mechanisms. During reoxygenation ROS/ RNS overproduction via ischemia-reperfusion
211 injury could activate redox-sensitive components inducing increases of antioxidant enzymes
212 concentrations like salivary SOD as an adaptive strategy.^[30]

213

214 Conclusion

215 In conclusion, RSA tests could be conducted in soccer athletes without short-term
216 immunosuppression risks as noted by unaltered sIg-A levels and exercise session load
217 parameters could be monitored through salivary cortisol evaluation. Additionally, uric acid
218 could be a key factor for TBARs maintenance during acute high intensity intermittent
219 protocol. Interestingly, increased levels of SOD in saliva seems to act as a second-line
220 defense mechanism against exercise-induced ROS/ RNS production after exercise, since it
221 seems that uric acid is more important as an antioxidant defense in the saliva. Thus, taken
222 together all these evaluations could be used as a reliable tool to training monitoring in high
223 performance athletes.

224

225 Practical Implications

226 Salivary analysis is a growing trend in research as an alternative biological fluid.

227 Our results show that some biochemical parameters are sensitive to acute physical
228 exercise related with training intensity.

229 Redox homeostasis in saliva could offer potential possibilities for additional training
230 adaptations monitoring.

231 These parameters could aid in training program design and fatigue evaluation for
232 soccer athletes.

233

234 Acknowledgements

235 We thank our exercising participants for their time and effort. We are grateful to the
236 Centro de Treinamento de Futebol/ Soccer Training Center (CETRAF) to provide the
237 participants athletes for the study. This work was supported by FAPERJ grant to G.C.L.

238 **References**

239

- 240 1 Bishop D, Girard O, Mendez-Villanueva A. Repeated-sprint ability - part II:
241 recommendations for training. *Sports Med* 2011;41:741–56.
- 242 2 Mohr M, Krustup P, Bangsbo J. Match performance of high-standard soccer players
243 with special reference to development of fatigue. *J Sport Sci* 2003;21:519–528.
- 244 3 McCall A, Davison M, Andersen TE, et al. Injury prevention strategies at the FIFA
245 2014 World cup: perceptions and practices of the physicians from the 32 participating
246 national teams. *Br J Sports Med* 2015;49:603–608.
- 247 4 Koka S, Beebe TJ, Merry SP, et al. The preferences of adult outpatients in medical or
248 dental care settings for giving saliva, urine or blood for clinical testing. *J Am Dent*
249 *Assoc* 2008;139:735–40.
- 250 5 Gröschl, M. Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem* 2008;11:1759–
251 1769.
- 252 6 Srinivasan M, Blackburn C, Mohamed M, et al. Literature-based discovery of salivary
253 biomarkers for type 2 diabetes mellitus. *Biomark Insights* 2015;14:39–45.
- 254 7 Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*
255 1987;32:279–312.
- 256 8 Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–126.
- 257 9 Kivlighan KT, Granger DA, Schwartz EB, et al. Quantifying blood leakage into the
258 oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone,
259 and testosterone in saliva. *Horm Behav* 2004;46:39–46.
- 260 10 Schwartz EB, Granger DA. Transferrin enzyme immunoassay for quantitative
261 monitoring of blood contamination in saliva. *Clin Chem* 2004;50:654–656.
- 262 11 De Oliveira VN, Bessa A, Lamounier RP, et al. Changes in the salivary biomarkers
263 induced by an effort test. *Int J Sports Med* 2010;6:377–81.
- 264 12 Tékus E, Kaj M, Szabó E, et al. Comparison of blood and saliva lactate level after
265 maximum intensity exercise. *Acta Biol Hung* 2012;63:89–98.

- 266 13 Bangsbo J, Iaia FM, Krstrup P. Metabolic response and fatigue in soccer. *Int J*
267 *Sports Physiol Perform* 2007;2:111–127.
- 268 14 Jones RM, Cook CC, Kilduff LP, et al. Relationship between repeated sprint ability
269 and aerobic capacity in professional soccer players. *ScientificWorldJournal*
270 2013;2013:1–5.
- 271 15 Faiss R, Léger B, Vesin JM, et al. Significant molecular and systemic adaptations
272 after repeated sprint training in hypoxia. *PLoS One* 2013;8:1–13.
- 273 16 Ramos-Filho D, Chicaybam G, de-Souza-Ferreira E, et al. High intensity interval
274 training (HIIT) induces specific changes in respiration and electron leakage in the
275 mitochondria of different rat skeletal muscles. *PLoS One* 2015;10:1–20.
- 276 17 Brandtzaeg P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *J Oral*
277 *Microbiol* 2013;5:1–24.
- 278 18 Gleeson M, Pyne D. Exercise effects on mucosal immunity. *Immuno Cell Biol*
279 2000;78:536–544.
- 280 19 Thomas NE, Leyshon A, Hughes MG, et al. The effect of anaerobic exercise on
281 salivary cortisol, testosterone and immunoglobulin (A) in boys aged 15–16 years. *Eur*
282 *J Appl Physiol* 2009;107:455–61.
- 283 20 Brownlee KK, Moore AW, Hackney AC. Relationship between circulating cortisol and
284 testosterone: Influence of physical activity. *J Sports Sci Med* 2005;4:76–83.
- 285 21 Crewther B, Cronin J, Keogh J, et al. The salivary testosterone and cortisol response
286 to three loading schemes. *J Strength Cond Res* 2008;22:250–255.
- 287 22 Mankowski T, Anton SD, Buford TW, et al. Antioxidants as modifiers of physiologic
288 adaptations to exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2015;47:1857–1868.
- 289 23 González D, Marquina R, Rondón N, et al. Effects of aerobic exercise on uric acid,
290 total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. *Res Sports*
291 *Med* 2008; 16:128–37.

- 292 24 Deminice R, Sicchieri T, Payão PO, et al. Blood and salivary oxidative stress
293 biomarkers following an acute session of resistance exercise in humans. *Int J Sports*
294 *Med* 2010;31:599–603.
- 295 25 Kidd PM. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage.
296 *Altern Med Rev* 1997;2:155–176.
- 297 26 Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in
298 humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc*
299 *Natl Acad Sci* 1981;78:6858–6862.
- 300 27 Kraus FW, Perry WI, Nickerson JF. Salivary catalase and peroxidase values in
301 normal subjects and in persons with periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral*
302 *Pathol* 1958;11:95–102.
- 303 28 Tsuber V, Kadamov Y, Tarasenko L. Activation of antioxidant defenses in whole
304 saliva by psychosocial stress is more manifested in young women than in young men.
305 *PLoS One* 2014;9:1–17.
- 306 29 Cavas L, Arpinar, Yurdakoc K. Possible interactions between antioxidant enzymes
307 and free sialic acids in saliva: a preliminary study on elite judoists. *Int J Sports Med*
308 2005;26:832–5.
- 309 30 Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, et al. Decreasing xanthine oxidase-
310 mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J*
311 *Physiol* 2005;567:113–120.

Table 1
Descriptive data of the athletes submitted of RSA (mean \pm standard deviation).

Age (y)	21.2 \pm 4.2
Height (m);	1.77 \pm 0.07
Body mass (kg)	74.8 \pm 10.1
Body mass index (Kg/m ²)	23.8 \pm 2.9
Repeated Sprint Ability Test (s)	
Sprint 1	6.68 \pm 0.05
Sprint 2	6.78 \pm 0.34
Sprint 3	6.84 \pm 0.34
Sprint 4	6.93 \pm 0.39 ^a
Sprint 5	6.98 \pm 0.43 ^a
Sprint 6	7.07 \pm 0.38 ^{abc}
Sprint 7	7.08 \pm 0.53 ^{abc}

^aSignificant difference with sprint 1°, p < 0.05. ^bSignificant difference with sprint 2°, p < 0.05. ^cSignificant difference with sprint 2°, p < 0.05.

Table 2
Salivary markers of the athletes submitted to RSA (mean \pm standard deviation)

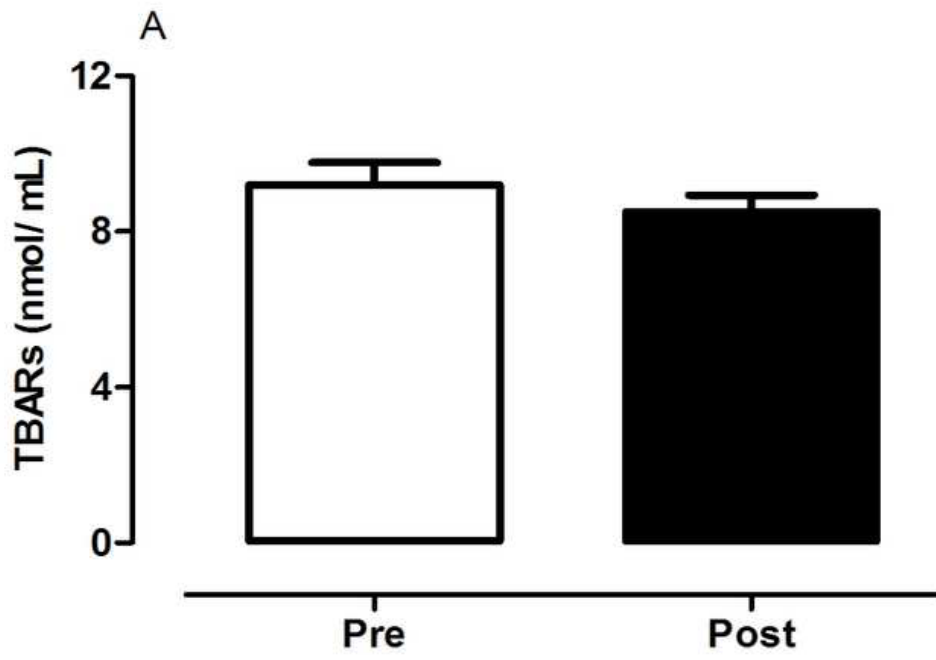
	Pre	Post
Transferrin (mg/L)	1.87 \pm 0.04	1.94 \pm 0.03
Total Protein (g/dL)	0.25 \pm 0.03	0.36 \pm 0.24 ^a
Lactate (mmol/L)	0.28 \pm 0.04	2.00 \pm 0.21 ^a
Cortisol (ng/ml)	12.88 \pm 0.90	17.27 \pm 1.27 ^a
IgA (μ g/mL)	531.80 \pm 25.27	546.70 \pm 13.36

^aSignificant difference with Pre; p<0,05.

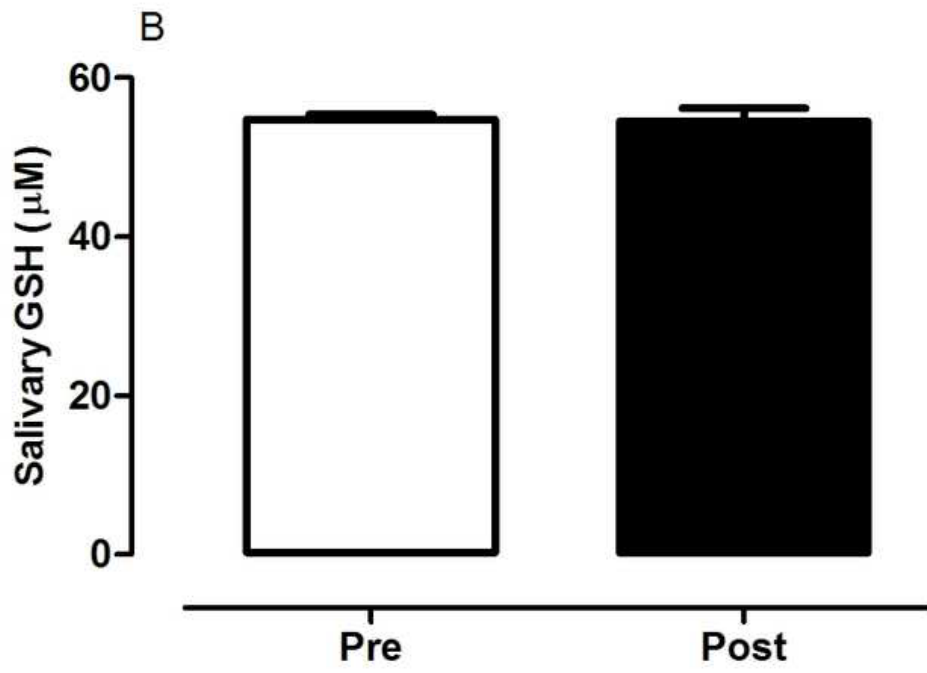
Figure legends

Fig 1. Salivary levels of TBARs (A), GSH (B), uric acid (C), SOD (D) and CAT (E) in professional soccer players at rest (Pre) and after RSA test (Post). ^aSignificant difference with Pre; $p < 0,05$.

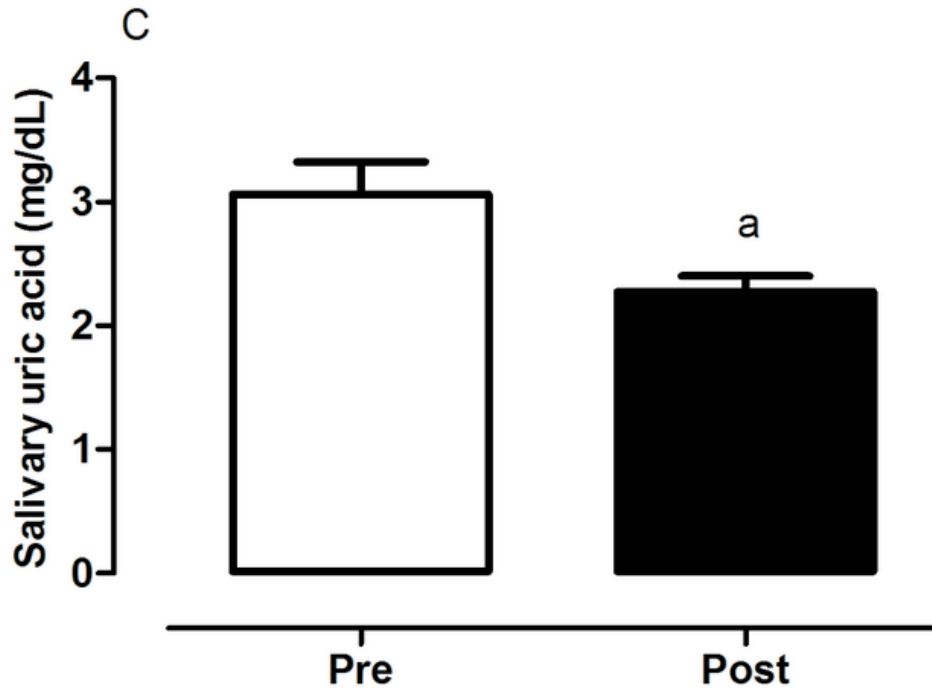
Figure(1A)
[Click here to download high resolution image](#)



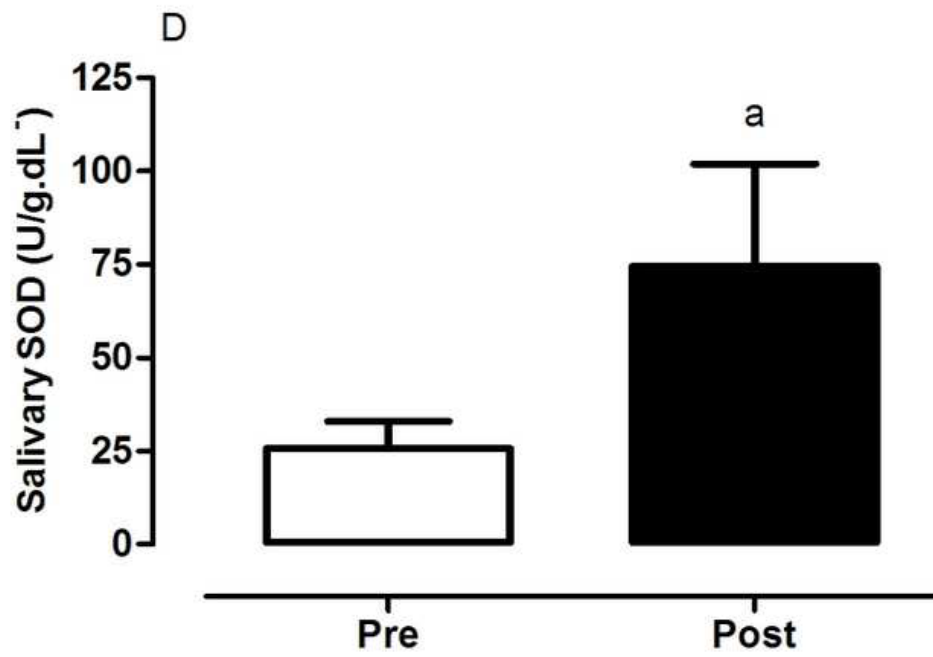
Figure(1B)
[Click here to download high resolution image](#)



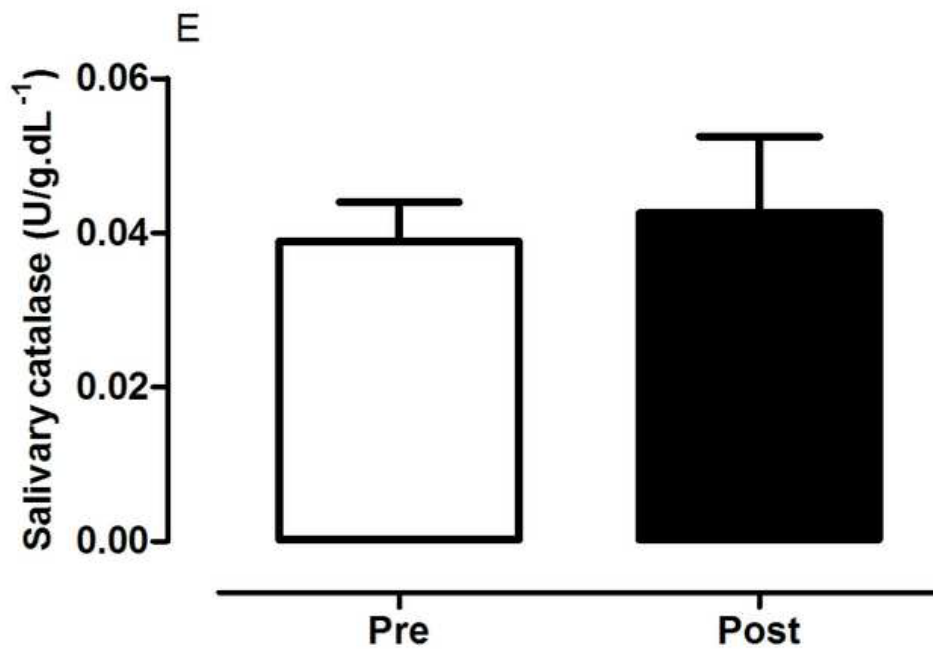
Figure(1C)
[Click here to download high resolution image](#)



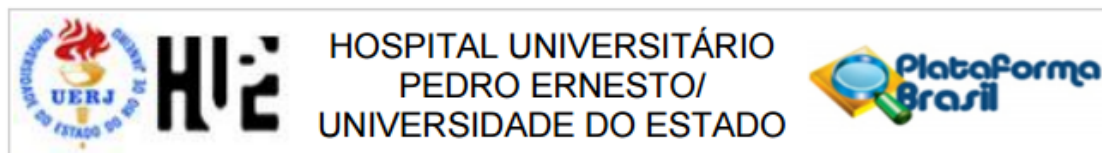
Figure(1D)
[Click here to download high resolution image](#)



Figure(1E)
[Click here to download high resolution image](#)



ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação de parâmetros antropométricos e bioquímicos em atletas.

Pesquisador: Gustavo Casimiro Lopes

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30711414.8.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 649.215

Data da Relatoria: 14/05/2014

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 15 de Maio de 2014

Assinado por:
MARIO FRITSCH TOROS NEVES
(Coordenador)

ANEXO B - Comprovação de submissão do 1º artigo científico

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Science and Medicine in Sport
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Salivary biochemical evaluation in professional soccer players
after repeated sprint ability test.

Article Type: Original Research

Keywords: Saliva, Biochemical Markers, Soccer Players, Sprint Test,
Exercise

Corresponding Author: Dr. Gustavo Casimiro, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Rio de Janeiro State University

First Author: Vinicius Rodrigues de Araujo

Order of Authors: Vinicius Rodrigues de Araujo; Patricia C Lisboa;
Fabiele A Carames; Luciane Pires; Dionizio Ramos-Filho; Gabriel
Boaventura; Elaine Oliveira; Egberto G Moura; Gustavo Casimiro-Lopes

Abstract: Objectives: To evaluate intensity of exercise, oral mucosal
immunity, redox homeostasis parameters in saliva of athletes subjected to
an acute high intensity intermittent exercise protocol.

Design: Cross-sectional study

Methods: Thirty-two professional soccer athletes (age $21.2 \pm 4.2y$) were
subjected to repeated sprint ability (RSA) test. Saliva aliquots were
collected at rest and immediately after RSA test.

Results: Lactate levels in saliva was increased when compared with
pretest values (6.95 fold-increase; $p < 0.05$). Total salivary protein
followed a similar pattern with increased levels observed after RSA test
(44%; $p < 0.05$). Salivary immunoglobulin-A (sIg-A) levels did not show any
significant differences after RSA test. Cortisol levels in saliva was
increased after RSA test (34%; $p < 0.05$) when compared with rest values.
Redox homeostasis parameters in saliva showed heterogeneous pattern after
RSA test. GSH and TBARS levels did not show any significant differences,
while uric acid levels in saliva was decreased after RSA test (-26%;
 $p < 0.05$). Interestingly, salivary SOD was increased (3.63 fold-increase;
 $p < 0.05$) while CAT levels in saliva did not achieve significant
differences. In conclusion, RSA tests could be conducted in soccer
athletes.

Conclusions: Salivary cortisol evaluation could allow load parameters
monitoring during exercise and unaltered sIg-A levels suggests the
absence of deleterious effects in oral mucosal immunity. Additionally,
uric acid could be a key factor for TBARS maintenance during acute high-
intensity intermittent protocol. Interestingly, increased levels of SOD
in saliva seem to act as a second-line defense mechanism against
exercise-induced ROS/ RNS production after exercise.

Suggested Reviewers: Pedro Paulo Soares
Universidade Federal Fluminense
ppsoares@id.uff.br