

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**

Departamento de Bioquímica

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Análises bioquímicas como adjuvante de aprimoramento atlético**

LUCIANO DE OLIVEIRA SIQUEIRA

Orientador:

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**

Departamento de Bioquímica

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Análises bioquímicas como adjuvante de aprimoramento atlético**

Doutorando: Luciano de Oliveira Siqueira

Orientador: Prof. José Cláudio Fonseca Moreira

Tese Submetida ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito para obtenção do grau de doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2009

CIP – Catalogação na Publicação

---

S618a Siqueira, Luciano de Oliveira  
Análises bioquímicas como adjuvante de aprimoramento atlético /  
Luciano de Oliveira Siqueira. – 2009.  
148 f. ; 30 cm.

Orientação: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira.  
Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

1. Exercícios físicos. 2. Traumatismos em atletas. 3. Medicina  
esportiva. 4. Aptidão física. I. Moreira, José Cláudio Fonseca,  
orientador. II. Título.

CDU : 796:61

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

Aos amigos e mestres  
Prof. Dr. Flavio H. Reginatto e  
Prof. Dr. José Cláudio F. Moreira

*“Conhece-te a ti mesmo, torna-te consciente de tua ignorância como sendo o ápice da sabedoria”*

Socrates (470-399 a.C)

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”.*

Friedrich Nietzsche (1844-1900)

## **Agradecimentos**

A Deus, nosso Grande Arquiteto do Universo, pelas bênçãos e inspiração, bem como sustentáculo para este mundo de provas e expiações;

Ao prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, pela paciência, inteligência e amizade. Eterno mestre!

A minha Esposa Lisiane, meus filhos Pedro Henrique e Ana Maria por serem a razão de minha vida;

Aos meus pais pelo amor, educação, discernimento ético e moral;

Aos meus familiares pelo amor e união;

Ao PPG em Ciências Biológicas: Bioquímica pela oportunidade de desenvolvimento profissional;

Às equipes e atletas que consentiram em participar voluntariamente do estudo;

À Labtest Diagnostica<sup>®</sup>, Bioclin<sup>®</sup> e Biotecnica Diagnostica<sup>®</sup> pelo fornecimento de insumos;

À Universidade de Passo Fundo e Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – Campus Erechim pela cessão de seus laboratórios e equipamentos;

A todos os colaboradores diretos e indiretos deste trabalho.

## ÍNDICE

### Parte 1

<b>I. Resumo e Abstract.....</b>	<b>9</b>
<b>II. Siglas e Abreviações.....</b>	<b>11</b>
<b>III. Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>IV. Objetivos.....</b>	<b>26</b>

### Parte 2.

<b>Artigos.....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo I:</b> análise de parâmetros bioquímicos séricos e urinários em atletas de meia maratona.....	28
<b>Capítulo II:</b> Serum and urine analysis of biochemical markers of proteolysis, lipolysis, hemolysis, and muscle injury in professional futsal players during training.....	61
<b>Capítulo III:</b> Effects of acute supplementation of chocolate and/or sports drinks on hematological and biochemical parameters of professional soccer players .....	84
<b>Capítulo IV:</b> Analyses of biochemical parameters and markers of oxidative markers in blood of indoor soccer athletes during a season.....	106

### Parte 3

<b>Discussão.....</b>	<b>129</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>135</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>137</b>

<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>139</b>
--	------------

#### **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1: Registro de óbitos de atletas profissionais de futebol veiculados na mídia no período de 2002 a 2009.....</b>	<b>16</b>
--	-----------

#### **Lista de figuras**

<b>Figura 1: Número de casos de morte súbita cardíaca pelo esporte.....</b>	<b>15</b>
---	-----------



## **Resumo**

O exercício físico regular tem auxiliado no controle de doenças crônicas e na melhoria da qualidade de vida da população em geral. Por outro lado, a prática esportiva de elite pode mostrar-se nociva para nosso organismo uma vez que ainda é desconhecido o real limite entre os efeitos benéficos e deletérios do exercício sobre o organismo de atletas profissionais. O aumento no consumo de  $O_2$  induz aumento na produção de ERO, que dependendo do estado redox dos atletas, pode induzir a diferentes níveis de estresse oxidativo. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um perfil bioquímico em diferentes condições de esforço em atletas profissionais em treinamento. Foram analisadas amostras de sangue e urina de atletas durante sessões de treinamento de diferentes intensidades. A análise dos resultados aponta que sessões de esforço de moderada intensidade e de longa duração apresentaram alterações bioquímicas de marcadores enzimáticos mais intensos quando comparadas com o de esforço intermitente. Mostraram também que as alterações bioquímicas apresentadas podem estar sujeitas a variáveis como temperatura, umidade, grau de hidratação e nutrição. Os resultados apontam que o controle laboratorial de marcadores de lesão e de catabolismo pode contribuir para diagnosticar quadros de comprometimento metabólico e conseqüentemente no rendimento atlético.

**Palavras-chave:** Lesões do Esporte, Medicina Esportiva, Desempenho Esportivo, Aptidão Física.

## **Abstract**

The regular exercise has helped in controlling chronic diseases and improves quality of life. Moreover, the practice of elite sport may be harmful to athletes as if unaware of the actual boundary between the deleterious and beneficial effects of exercise on professional athletes. The increase in the consumption of O<sub>2</sub> leads to increased production of ROS, which depending on the redox status of athletes, may lead to different levels of oxidative stress. The aim of this study was to establish a biochemical profile in different conditions of effort in professional athletes in training. samples of blood and urine of athletes during training sessions of different intensities were analyzed. Results suggest that session of moderate intensity exercise effort and long-term made more intense biochemical changes when compared to intermittent effort, showing that biochemical changes may be subject to variables such as temperature, humidity, degree of hydration and nutrition. The results show that the control laboratory markers of injury and catabolism may contribute to diagnose metabolic impairment frames and therefore in athletic performance.

**Keywords:** Sport injuries, Athletic Performance, Sports Medicine, Physical Fitness

## II. Siglas e abreviações

AGEs: Advanced Glycation End-products (Produtos Finais da Glicação Avançada)

ALA-D: Àcido Aminolevulínico Desidrogenase

ALP: Alkaline Phosphatase (Fosfatase alcalina)

ALT: Alanina Aminotransferase

AST: Aspartato Aminotransferase

CAT: Catalase

CDC: Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controle de Prevenção de Doenças)

CK: Creatina Quinase

CK-mb: Creatina Quinase fração mb

CK-mm: Creatina Quinase fração mm

DNPH: Dinitrophenylhydrazine (Dinitrofenilhidrazina)

ERO: Espécies Reativas do Oxigênio

ERN: Espécies Reativas do Nitrogênio

FCM: Frequência Cardíaca Máxima

GH: Grow Hormone (Hormônio do crescimento)

GSSG: Glutationa Oxidada

GSH: Glutationa Reduzida

GT: Glutationa Total;

GPx: Glutationa Peroxidase

HCT: Hematócrito (%)

HDL: High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)

HGB: Hemoglobina (g/dl)

ILs: Interleucinas

INF: Interferons

LDH: Lactato Desidrogenase

LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)

VCM: Volume Corpuscular Médio (fl)

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média (pg/dl)

MS: Morte Súbita

NO: Óxido Nítrico

PLT: Platelets (Plaquetas)

RBC: Red Blood Cells (Eritrometria)

RDW: Red Cell Distribution Width (Amplitude de distribuição Eritrocitária)

TBA: Thiobarbituric acid (Ácido tiobarbitúrico)

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TCA: Àcido tricloroacético

TIBC: Total Iron Binding Complex (Capacidade Ferropéxica ou Capacidade de Ligação ao Ferro)

TNF: Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)

VLDL: Very low density lipoprotein (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade)

VO<sub>2</sub>máx: Volume Máximo de Oxigênio

WBC: White Blood Cells (Leucometria)

### III. Introdução

Atualmente, verifica-se um grande avanço no campo de estudo relacionando atividade física e eventos aterotrombóticos. De fato, assume-se que há uma estreita correlação entre a prática insuficiente de atividade física e as dislipidemias que possa explicar parcialmente o maior risco predisponente ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares quando comparados com indivíduos fisicamente ativos (Guedes e Gonçalves, 2007; Katzmarzyk *et al*, 2004; Bassuk e Manson, 2003).

Com intuito de promover a saúde, uma diversidade de estudos com diferentes protocolos de aplicação tem sido realizada para determinar a intensidade/duração ideal de treinamento, de acordo com cada indivíduo e prática esportiva. No entanto, para a obtenção desta resposta ideal, deve-se considerar que a velocidade de adaptação do indivíduo ao treinamento é limitada, variável e depende quase que exclusivamente de sua capacidade orgânica (Wilmore e Costill, 1987; McArdle *et al*, 1998).

Apesar da comprovação científica dos efeitos benéficos da atividade física no controle de doenças crônicas e na melhora da qualidade de vida em indivíduos não-atletas, a prática esportiva de elite tem sido revista na literatura em virtude de seu potencial deletério para o organismo (Robertson *et al* 1991; McArdle *et al*, 1998). Esse potencial negativo baseia-se no argumento de que apesar da intensidade e duração de treinamento ser importantes variáveis para o desenvolvimento de um bom condicionamento físico, outros fatores também podem comprometer o desempenho como: temperatura, umidade, altitude, hidratação e alimentação.

Isso tudo mostra que é tênue o limite entre os efeitos benéficos e deletérios do exercício sobre nosso organismo, particularmente em atletas profissionais, uma vez que o praticam no limite da capacidade humana. Para se determinar estes efeitos,

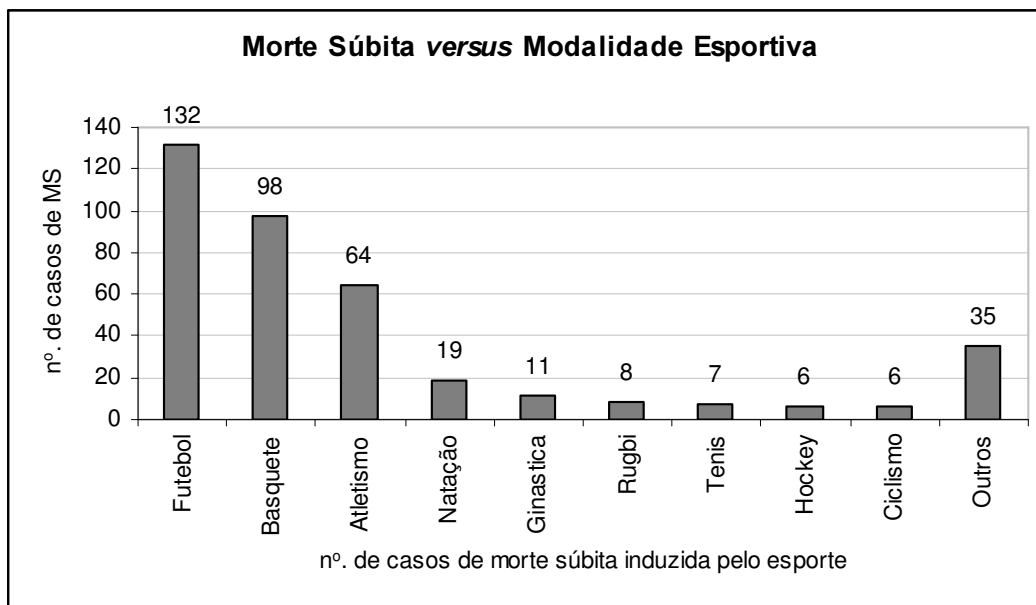
deve-se levar em consideração que estão diretamente relacionados com variáveis difíceis de serem plenamente controladas experimentalmente. Em razão disso, o limite entre a saúde e o sobre-treinamento (*overtraining*) ainda é inconclusivo e carente de muitas respostas pela comunidade científica.

A busca por resultados e desempenho cada vez mais competitivos, leva os atletas a superar seus próprios limites orgânicos. São considerados indutores desta exigência exacerbada: superação de marcas, apuração do melhor resultado, seleção entre indivíduos e grupos, avaliação de rendimento, comparação de resultado e desempenho, busca da vitória, vitória a qualquer custo, guerra de patrocinadores dentre outros (De Rose Jr, 2002; Hanton *et al*, 2004).

Neste contexto, tem se tornado freqüente a comunicação de mortes de atletas durante um treinamento ou uma prática esportiva, particularmente aqueles esportes caracterizados pela elevada intensidade e duração. Uma das razões é a velocidade das informações da atualidade. Por outro lado, dentre as possíveis causas de morte induzidas pelo esporte, pode-se citar a morte súbita, oriundas principalmente de quadros de hiponatremia, miopatia congênita, miocardiopatia hipertrófica e a displasia arritmogênica do ventrículo direito (Bronzatto *et al*, 2001; Ghorayeb *et al*, 2007).

Uma publicação do Comitê Olímpico Internacional mostra que de 1966 a 2004 foram registradas 1.101 mortes súbitas (MS) de jovens atletas com menos de 35 anos, numa média de 29 por ano. Dos casos de MS registrados, mostra uma predominância de casos principalmente no futebol e basquete (Figura 1), esportes que apresentam característica preponderante o esforço intermitente (Bille *et al* 2006). Uma das hipóteses ligadas ao elevado número de óbitos pode estar

relacionado ao fato de que o futebol e o basquete são os esportes mais populares e conseqüentemente mais praticados no Brasil e no mundo.



Adaptado de Bille *et al* (2006)

**Figura 1:** Número de casos de morte súbita cardíaca pelo esporte.

A tabela 1 mostra um esboço de relatos ligados ao futebol expostos pelos diferentes meios de mídia nos últimos 7 anos.

**Tabela 1:** Registro de óbitos de atletas profissionais de futebol veiculados na mídia no período de 2002 a 2009.

Nacionalidade	Nome	Idade (anos)	Time	Localidade	Ano
Brasil	José Carvalho da Cunha Júnior (Rabicó)	39	Assaf	Brasil	2009
Espanha	Antonio Puerta	22	Sevilla	Espanha	2007
Paraguai	Sixto Rojas	26	Atlético Trinidense	Paraguai	2007
Equador	Jairo Andrés Nazareno	21	Chimborazo	Equador	2007
Gâmbia	Chaswe Nsofwa	27	Hapoel Beersheva	Israel	2006
Egito	Mohamed Abdelwahab	23	Al-Ahly	Egito	2006
Portugal	Hugo Cunha	28	União de Leiria	Portugal	2005
Eslovênia	Nedžad Botonjic	28	NK Ljubljana	Eslovênia	2005
Brasil	Serginho	30	São Caetano	Brasil	2004
Hungria	Miklos Fehér	24	Benfica	Portugal	2004
Camarões	Marc-Vivien Foé	28	Seleção camaronesa	Camarões	2003
Brasil	Maximiliano Ferreira	21	Botafogo	Brasil	2003
Chile	Manuel Mondaca	17	Seleção Sub-17	Chile	2003
Ucrânia	Andrei Pavistski	17	Arsenal Kiev	Ucrânia	2003
Brasil	Márcio dos Santos	28	Deportivo Wanka	Peru	2002

Fonte: Fontes diversas de mídia eletrônica (WWW)

A ampla divulgação pela mídia de eventos mórbidos ligados a prática esportiva, justifica a capacitação de profissionais ligados ao esporte para compreender os mecanismos clínicos da adaptação bioquímica dos atletas bem como a aplicação destes conhecimentos para o diagnóstico precoce de lesões silenciosas mediante a realização de ensaios bioquímicos guiados pela clínica.



O exercício de baixa intensidade e longa duração, caracterizados por contração e relaxamento lento, predomínio de fibra muscular de tipo I, são características de esportes de resistência, como a maratona. Por outro lado, o exercício da alta intensidade e curta duração, caracterizados por contração e relaxamento rápido, predomínio de fibra muscular de tipo II, são características de esportes de explosão muscular, como a corrida de 100m rasos. Existem ainda aqueles esportes que exigem tanto um quanto outro tipo de metabolismo. São ditos esportes de esforço intermitente, que é o caso do futebol e do basquete, principais causas de óbito por morte súbita cardíaca (Bille *et al* 2006; Maughan *et al* 2000; Panissa *et al* 2009).

Devido à sua natureza e intensidade acíclica, futebol é classificado como um esporte de intensidade alta e intermitente (Reilly 1997; Altimari *et al* 2008). Durante uma partida de futebol oficial, jogadores de elite podem cobrir uma distância média de 10-13 km em uma intensidade média perto do limiar anaeróbico, sendo 80-90% da frequência cardíaca máxima (FCM) ou 70-80% do volume máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx). Estima-se que o metabolismo aeróbico fornece 90% do balanço energético de um atleta de futebol durante uma partida (McMillan *et al*, 1994; McMillan *et al* 2005; Bangsbo 2006).

### III.b. Radicais Livres e antioxidantes

Radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell and Gutteridge, 2007). O desemparelhamento de elétrons da última camada atômica lhes confere elevada reatividade. O ataque oxidativo a moléculas de oxigênio e nitrogênio pode induzir à produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e espécies reativas

do nitrogênio (ERN) que são encontradas em quase todos os sistemas biológicos (Dröge, 2002; Valko et al 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007; Shrivastava *et al* 2004, Moncada and Higgs, 2001).

Em condições fisiológicas do metabolismo aeróbio, o O<sub>2</sub> sofre sucessivas reduções, resultando na formação de H<sub>2</sub>O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidroperoxila (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Normalmente, a redução completa do O<sub>2</sub> ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (Dröge, 2002; Valko et al 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007).

Por outro lado, as espécies reativas do nitrogênio também são considerados importantes indutores de estresse oxidativo. É o caso do dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e óxido nítrico (NO), dentre outros (Shrivastava *et al* 2004).

Tanto as ERO quanto as ERN, podem apresentar efeitos benéficos ou deletérios para o organismo. Os ERO e os ERN são normalmente produzidas por enzimas firmemente reguladas, tais como a NO sintase (NOS) e isoformas da NADPH oxidase. (Shrivastava *et al* 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007; Dröge, 2002)

Dentre inúmeras hipóteses de indução de RLs induzidos pelo esporte podemos citar: Interrupções temporárias das bombas de ATP dependentes de cálcio, ativação leucocitária, metabolismo prostanóide, aumento da atividade da óxido nítrico sintase em condições de hipóxia, processo de isquemia/reperfusão, hiperatividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Viña et al, 2000). Estas hipóteses podem resultar em estresse oxidativo, um processo deletério que pode ser um importante mediador de danos a estruturas celulares, incluindo os lipídeos e membranas, proteínas e DNA (Schneider and Oliveira, 2004). Em

contrapartida, os efeitos positivos das ERO / ERN que apresentam baixa/moderada concentrações fisiológicas, desenvolvem importantes atividades celulares como: defesa contra agentes infecciosos, neurotransmissores, vasodilatadores, bem como indução a mitoses. Curiosamente, diversas ações mediadas por radicais livres têm na realidade a função de proteger células contra outros radicais livres induzidos por estresse oxidativo para restabelecer ou manter a homeostase redox (Dröge, 2002; Valko *et al* 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007; Shrivastava *et al* 2004).

### III.b.1. Defesas antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que apresentam propriedades de bloquear a formação de radicais livres ou interagir com estes, tornando-os inativos (*quenchers* e *scavengers*, respectivamente) (Karadag *et al* 2009). A neutralização precoce dos radicais livres é capaz de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, seqüestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos, conseqüentemente inibindo a lipoperoxidação (Dröge, 2002; Valko *et al* 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007; Shrivastava *et al* 2004, Schneider and Oliveira, 2004, Bjelakovic *et al* 2007; Jordão *et al* 1998).

Os antioxidantes endógenos podem ser divididos nas seguintes categorias: antioxidantes enzimáticos; antioxidantes solúveis e seqüestradores de metais de transição. (Dröge, 2002; Valko *et al* 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007; Shrivastava *et al* 2004, Schneider and Oliveira, 2004, Bjelakovic *et al* 2007; Jordão *et al* 1998).

### III.b.1.1. *Antioxidantes enzimáticos*

As enzimas antioxidantes são a primeira linha de defesa contra espécies reativas ou radicais livres de oxigênio. As principais enzimas antioxidantes são: a superóxido dismutase (SOD); a catalase e a glutaciona peroxidase (GSH-Px). (Dröge, 2002; Valko *et al* 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007; Shrivastava *et al* 2004, Schneider and Oliveira, 2004, Bjelakovic *et al* 2007; Jordão *et al* 1998).

### III.b.1.2. *Antioxidantes solúveis*

Encontram-se na circulação e/ou nos fluidos intersticiais. Podem neutralizar diretamente os radicais livres ou através da co-participação de sistemas enzimáticos. Exemplos: retinol, tocoferol, glutaciona, ácido úrico, bilirrubina, ascorbato, flavonóides, carotenóides, licopeno. (Dröge, 2002; Valko *et al* 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007; Shrivastava *et al* 2004, Schneider and Oliveira, 2004, Bjelakovic *et al* 2007; Jordão *et al* 1998).

### III.b.1.3. *Seqüestradores de metais de transição*

Os seqüestradores de metais de transição apresentam a propriedade de seqüestrar metais de transição, como ferro e cobre, que induzem ou amplificam a cascata oxidativa mediante reação de Fenton ou Waber Weiss. Exemplo: ceruplasmina, albumina, transferrina, metalotioneína (Dröge, 2002; Valko *et al* 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007; Shrivastava *et al* 2004, Schneider and Oliveira, 2004, Bjelakovic *et al* 2007; Jordão *et al* 1998).

### III.c. Marcadores bioquímicos e o esporte

A sobrecarga muscular induzida pela prática esportiva pode causar dano muscular que pode ser proporcional à intensidade, duração e ao tipo de exercício. (Thompson *et al* 2001).

Atividades de resistência podem exibir menores índices de lesão muscular quando comparadas com exercícios que incluem alto vigor em contrações excêntricas, mas, em ambos os casos, pode haver dano à arquitetura muscular. Os indicadores bioquímicos e ultraestruturais desses danos musculares apresentam um pico entre  $2 \pm 5$  dias após a cessação da atividade, e apresentam sinais de reparação dentro de 7 a 10 dias (Thompson *et al* 2001).

### III.d. Marcadores plasmáticos

Pelo fato de sofrer regulação por variáveis como: temperatura, umidade, tipo de esporte, altitude, intensidade e duração do treino, a adoção de valores de referência para diagnóstico de desempenho e de dano muscular ainda é inconclusivo.

O estresse do exercício é acentuado pela desidratação, que pode elevar a temperatura corporal, prejudicando as respostas fisiológicas do indivíduo com conseqüente risco para a saúde. Os primeiros sinais podem se tornar evidentes mesmo em uma desidratação seja leve ou moderada, com até 2% de perda do peso corporal, agravando-se à medida que ela se acentua (SBME, 2009).

A perda hídrica acentuada pela sudorese pode gerar um estado de hiponatremia e desequilíbrio eletrolítico. Entretanto este quadro não é comum, sendo mais freqüentemente observado em exercícios com mais de 4 h de duração ou pela ingestão de grandes quantidades de água sem ingestão de sódio. Se quantidades

suficientes de sódio e água são ingeridas, a osmolalidade plasmática e a concentração de sódio não declinam, porém este fato não ocorre com a ingestão apenas de água (Brito e Marins, 2005; Sawka e Montain, 2002; McKenna *et al*; 2008, Mara *et al* 2007).

Amplamente descrita na literatura, as alterações hematológicas e hemodinâmicas induzidas pelo esporte também são variáveis que podem influenciar o desempenho do atleta em decorrência de alterações na massa de eritrócitos como: hemodiluição, hemólise, hematúria, sangramento gastrintestinal, alteração da forma do eritrócito, depleção de ferro, aumento na liberação de hormônios com ação hematopoiética (cortisol e catecolaminas) e adaptação do sistema imune que podem mimetizar um processo inflamatório (Reid *et al* 2004; Pitsis *et al* 2004).

O aumento da necessidade de oxigenação dos tecidos faz com que o treinamento físico promova um aumento da mioglobina e dos sistemas enzimáticos hematopoiéticos. Esta aceleração promove uma maior utilização do ferro ocasionando uma diminuição sérica (ferropenia) e de suas reservas (hipoferritinemia). A deficiência de ferro tem como efeito uma anemia leve, que modifica o desempenho esportivo por diminuição das trocas de oxigênio e dióxido de carbono no interior da fibra muscular (Fallon 2004; Zoller e Vogel 2004).

A atividade física extenuante pode danificar uma quantidade de tecido muscular suficiente para desencadear uma resposta inflamatória aguda. (Wu *et al*, 2004; Bassit *et al* 2002). Esta resposta imunológica envolve uma cascata de reações complexas do sistema imune, ativando e estimulando a liberação de inúmeros elementos, tais como: fator de necrose tumoral, interferons, interleucinas ou outras citocinas (Wu *et al*, 2004; Bassit *et al* 2002)

Os efeitos agudos do esforço físico estimulam várias respostas do sistema imune como: leucocitose (decorrente da secreção de epinefrina e cortisol); neutrofilia (decorrente da desmarginalização de neutrófilos do endotélio, alterações hemodinâmicas e ação de catecolaminas); linfocitose (pelo aumento no recrutamento de todas as sub populações de linfócitos – linfócitos T, B e NK, sendo que as células NK são as mais sensíveis à ação da epinefrina) e monocitose (decorrente da ação do cortisol no início do processo de recuperação quando o exercício cessa) (Wu *et al* 2004; Bassit *et al* 2002, Reid *et al* 2004; Pitsis *et al* 2004, Fallon 2004).

De fato, as alterações bioquímicas induzidas pelo esporte são evidentes, principalmente na melhora do perfil lipídico e conseqüentemente no risco de eventos cardiovasculares (Olchawa *et al* 2004; Brites 2004). No entanto, na maioria dos casos, contribui com o decréscimo da concentração de triglicerídeos e uma melhora na relação colesterol LDL/HDL. Por outro lado, a maioria dos estudos aponta que independentemente do tipo de treinamento, a prática esportiva pouco influencia nas concentrações plasmáticas de colesterol total (Olchawa *et al* 2004; Brites 2004).

### III.e. Marcadores de estresse oxidativo em atletas.

Os exercícios de predomínio anaeróbico, em especial aqueles com piques de corrida (*sprints*), são comumente utilizados por atletas e outros indivíduos que treinam regularmente em uma tentativa de melhorar a velocidade, força e desempenho atlético. Tal condição pode se revelar prejudicial ao longo do tempo, como o estresse oxidativo crônico, que foi associado a uma variedade de estados patológicos. A corrida de resistência demonstra pouca ou nenhuma mudança em

biomarcadores após exercício, quando comparada com o exercício de força (Edge 2005).

Aumentos na oxidação de macromoléculas têm sido demonstrados após tanto em exercício de predomínio aeróbio quanto anaeróbio. Sugerindo que a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e posterior oxidação de macromoléculas podem levar a um estado de estresse oxidativo. (Edge *et al* 2005; Bloomer *et al* 2006).

Com relação ao exercício anaeróbico, outras vias de geração de EROs e ERNs podem ser incluídas: condições de isquemia/reperfusão, ativação da xantina oxidase e NADPH oxidase, metabolismo prostanóide, *burst* respiratório, atividade fagocítica e ruptura de proteínas ricas em ferro (Viña *et al*, 2000, Edge *et al* 2005; Bloomer *et al* 2006).

Desde a década de 80, o estudo de marcadores plasmáticos de desempenho atlético e de diagnóstico de lesões silenciosas tem sido extensivamente pesquisado pela comunidade científica. Muitos marcadores têm seus mecanismos bioquímicos bem descritos e conhecidos (hormônios e enzimas), no entanto, existem outros carentes de estudo e de aplicação diagnóstica (proteínas e marcadores de estresse oxidativo).

A utilização da bioquímica como adjuvante de adaptações fisiológicas induzidas pelo esporte tem crescido muito nos últimos anos com intuito de prevenir lesões, reduzir o tempo de recuperação e aprimorar o rendimento como forma de obtenção de resultados cada dia mais competitivos. Há uma grande dificuldade na reprodutibilidade de resultados experimentais e conseqüentemente no discernimento entre alterações fisiológicas/transitórias das patológicas/permanentes. Partindo destes princípios, propomos a utilização de marcadores reconhecidos na



comunidade científica para intervir, de forma multiprofissional, em atletas de diferentes esportes como forma de aperfeiçoamento atlético.

## **IV. Objetivos**

### Objetivo geral

Estabelecer um perfil bioquímico em atletas profissionais de diferentes modalidades esportivas sob diferenciados protocolos de treinamento.

### Objetivos específicos

1) Determinar as alterações bioquímicas e hematopoiéticas em atletas profissionais durante exercício de moderada intensidade e longa duração.

2) Analisar as adaptações bioquímicas agudas em atletas de futsal após esforço intermitente.

3) Avaliar a eficácia da suplementação de chocolate e solução de eletrólitos durante sessão de treinamento intermitente em atletas de futebol.

4) Avaliar os diversos parâmetros indicadores de estresse oxidativo em atletas profissionais de futsal durante uma temporada.

## **Parte 2. Artigos**

**CAPITULO I:** Análise de parametros bioquímicos séricos e urinários em atletas de meia maratona

**CAPITULO II:** Serum and urine analysis of biochemical markers of proteolysis, lipolysis, hemolysis, and muscle injury in professional futsal players during training.

**CAPITULO III:** Acute supplementation of chocolate and/or sports drinks on biochemical parameters of soccer players.

**CAPITULO IV:** Analyses of biochemical parameters and markers of oxidative status in blood of indoor soccer athletes during season.

Capítulo I:

**Análise de parâmetros bioquímicos séricos e urinários em atletas de  
meia maratona**

Arq Bras Endocrinol Metab. 2009; 53(7); 844-852

**ANÁLISE DE PARAMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS E URINÁRIOS EM  
ATLETAS DE MEIA MARATONA**

Biochemist plasmatic and urinary parameters analisys in marathon athletes.

Luciano de Oliveira Siqueira<sup>1</sup>, Tiane Muccini<sup>1</sup>, Iandra Dall Agno<sup>1</sup>, Lauren Filla<sup>1</sup>,  
Paula Tibbola<sup>1</sup>, Andiara Luvison<sup>1</sup>, Leandro Costa<sup>1</sup> e Jose Cludio Fonseca Moreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Passo Fundo, Instituto de Ciências Biológicas, Curso de Farmácia,  
Passo Fundo, RS, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor: Luciano de Oliveira Siqueira

Universidade de Passo Fundo - Curso de Farmácia

BR 285, Km 171 Campus I – Bairro São José

99010-210 Passo Fundo-RS

E-mail: luciano@upf.br

**Título abreviado:** ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE MEIA MARATONISTAS

## RESUMO

Exercício físico intenso pode estar associado à ocorrência de danos musculares que podem ser identificadas no soro e na urina de atletas. A análise de marcadores bioquímicos podem ser utilizados como marcadores de desempenho atlético, quando analisadas à luz de um contexto clínico e desempenho atlético. Foram coletadas amostras de sangue periférico (8mL) e de urina (15-50ml) de 20 maratonistas profissionais em repouso e 15 min. após meia maratona. A seguir, realizou-se hemograma, exame de urina e análise de marcadores bioquímicos de função renal, lesão muscular e lipidograma. A análise estatística dos resultados mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade sérica das enzimas CK, CK-MM, CK-MB e LDH; na concentração sérica de creatinina, ferro sérico, leucócitos e neutrófilos. Por outro lado, triglicérides, VLDL, ácido úrico sérico apresentaram um decréscimo significante. O presente estudo mostra que os atletas analisados apresentam alterações nos parâmetros bioquímicos do sangue e urina após uma prova nessa modalidade, demonstrando a importância da realização de exames laboratoriais como forma de diagnóstico de distúrbios bioquímicos silenciosos.

Palavras-chave: Atletismo, análise química do sangue, lesões.

## **ABSTRACT**

Physical exercise may be associated with intense occurrence of muscle damage that can be identified in the serum and urine of athletes, using them as markers of athletic performance when analyzed in light of a clinical history. Samples of peripheral blood (8mL) and urine (50 mL) were collected from 20 marathon athletes at rest and 15 minutes after half marathon. There has been blood, examination of urine and serum markers of renal function, muscle damage and lipid profile. Statistical analysis of the results showed a significant increase ( $p < 0,05$ ) in serum activity of the enzymes CK, CK-MM, CK-MB and LDH, plasmatic creatinine, plasmatic iron, leukocyte count and neutrophils. Furthermore, triglycerides, VLDL, uric acid in serum showed a significant decrease. This study shows that athletes to marathon show changes in biochemical parameters of blood and urine after a test in that mode, demonstrating the importance of carrying out laboratory tests as a diagnosis for silent biochemical disorders.

Keywords: Sports, Blood Chemical Analysis, injuries

## INTRODUÇÃO

O organismo dispõe de diversos mecanismos de produção de energia, síntese, degradação e remoção de compostos que compreendem o metabolismo basal de um indivíduo. A prática esportiva requer uma adaptação metabólica para atender a demanda energética acelerada, bem como a remoção de metabólitos desnecessários para o organismo. A adaptação orgânica depende do tipo, da intensidade e também da duração do exercício (1-7). Para um bom condicionamento é necessário que as funções orgânicas do indivíduo estejam plenamente ajustadas, uma vez que a atividade motora implica em graus de sobrecargas diferenciadas sobre os sistemas que compõem o corpo humano, marcadamente o muscular e o cardiorrespiratório (1,4,5,7,).

Estudos com atletas de resistência apontam modificações bioquímicas típicas 12-24 horas após prática esportiva, caracterizadas por aumento da atividade da lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase total e frações (CK-MM e MB, respectivamente). Muitas vezes a elevação da atividade/concentração de alguns marcadores bioquímicos de lesão não acompanha modificações significativas no eletrocardiograma, no exame clínico ou no desempenho atlético. Esta condição pode ser exemplificada pelo fato de que alguns atletas podem apresentar uma elevação de cerca de 30 vezes na atividade da CK após 24 horas do esforço sem qualquer comprometimento no desempenho ou na sua saúde. Por outro lado, um quadro de rabdomiólise pode ser detectado em atletas cuja CK esteja aumentada em 15 vezes ou ainda menos. Isso mostra a necessidade da intervenção multiprofissional uma vez que, ainda se desconhece o verdadeiro limite bioquímico entre a adaptação ao exercício e o início de *overtraining* (2,4-14).



Estudos envolvendo valores de referência para parâmetros bioquímicos e hematológicos de atletas profissionais durante uma sessão de treinamento ainda são inconclusivos (3-7). Isso se deve ao fato de que algumas alterações bioquímicas são passíveis de influência do gênero, variação cronobiológica, circadiana, repouso prévio, intensidade do treinamento, sazonalidade, condições climáticas, hidratação, entre outros. Além disso, diversos relatos apontam alterações bioquímicas normais, não representando alguma alteração patológica, dificultando o diagnóstico de lesões silenciosas (6-14). Desta forma, o diagnóstico clínico de microlesão e de overtraining deve sempre ser realizados considerando aspectos bioquímicos, clínicos e de desempenho atlético (3, 4, 6, 10-13).

Apesar de estudada exaustivamente desde a década de 80, ainda há uma grande carência de estudos bioquímicos em atletas sob condições específicas de treinamento, esforço e clima disponível na literatura. Essa carência impede a realização de metanálises confiáveis para obtenção de valores bioquímicos de referência em diferentes situações de esforço. Partindo destes princípios, o objetivo do presente estudo foi analisar as alterações bioquímicas agudas de parâmetros laboratoriais de atletas profissionais em início de temporada, submetidos a uma prova de meia maratona.

## **MATERIAL E METODOLOGIA**

### **Casuística:**

Foram incluídos no estudo 20 maratonistas profissionais do sexo masculino. Realizou-se uma anamnese, constituída de uma entrevista padrão a respeito do uso de medicamentos, suplementos, tempo de treinamento e distância percorrida por semana. Todos treinavam diariamente a mais de dois anos, usando tênis à prova de impacto e apropriado para corrida; com prévia ingestão de uma refeição leve e que concluíram a prova até 15 minutos após o primeiro colocado. Nenhum deles era fumante ou fazia uso de medicação no momento da análise e não possuíam histórico de doenças crônico/degenerativas.

O protocolo do estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, segundo o regulamento 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde sob registro nº 526/2005. Todos os atletas aceitaram participar do estudo voluntariamente, após terem sido informados dos objetivos e possíveis riscos do estudo. A seguir, foi assinado o termo de consentimento informado conforme o Código de Nuremberg (1947), Declaração dos Direitos do Homem (1948) e a Declaração de Helsinque (Anexo 1)

### **Condições ambientais:**

A meia maratona ocorreu às 9:00 da manhã, em pista asfáltica a uma altitude de 687m do nível do mar; à temperatura ambiente de 5°C, clima seco e ensolarado. Os atletas realizaram a prova com roupas leves e percorreram 21km num tempo médio de 70±7 min.

### **Análises laboratoriais:**

#### a) Sangue:

Amostras de sangue foram coletadas, com anti-sepsia prévia da fossa antecubital dos atletas, 15 minutos antes do aquecimento e da corrida e 15 minutos após seu término. Parte da amostra colhida (8ml) foi acondicionada em tubo de ensaio sem anticoagulante e centrifugada a 1500 RPM por 15 minutos. O soro extraído foi acondicionado em microtubos (Eppendorf) para posterior dosagem bioquímica de glicose, ácido úrico, creatinina, proteínas, uréia, creatina quinase total e fração MB, lactato desidrogenase, fosfatase alcalina, triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL), ferro sérico e capacidade ferropéxica (TIBC). Utilizou-se kits da marca Labtest Diagnóstica<sup>®</sup> e Biotécnica<sup>®</sup> em protocolos específicos para sua determinação em equipamento semi-automatizado da marca Labquest<sup>®</sup>. 2ml de sangue total foram acondicionados em um frasco contendo 2mg/ml de etilenodiaminotetracético (EDTA) para análise hematológica. O hemograma foi realizado mediante contagem eletrônica de células por análise de impedância (Sysmex XS 1000i<sup>®</sup>). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada mediante análise microscópica de 200 células (Nikon Eclipse 600<sup>®</sup>) em uma distensão sanguínea corada pelo método de Romanowsky (Merck<sup>®</sup>).

#### b) Urina:

Coletou-se entre 20-50mL do jato médio de urina de cada indivíduo em repouso e até 15 minutos após a meia maratona. As amostras foram acondicionadas em frascos padrão que foram transportados do local de coleta até o laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade de Passo Fundo em temperatura

controlada. Imediatamente as amostras foram processadas mediante análise físico-química e microscópica do sedimento, conforme recomendado pela ABNT-CB 36. As amostras foram centrifugadas a 1800 RPM por 10 minutos e 1ml do sobrenadante foi retirado para posterior análise bioquímica de proteínas totais, ácido úrico, creatinina e uréia.

Realizou-se a análise físico-química da urina mediante observação visual do aspecto e coloração da mesma. A densidade foi determinada com refratômetro (LF<sup>®</sup>). Procedeu-se a análise química utilizando fita de polieletrólitos (ComburTest Dade-Behring<sup>®</sup>) para detecção semi-quantitativa de proteínas, glicose, nitrito, bilirrubina, pH, corpos cetônicos, leucócitos, sangue e urobilinogênio na amostra de urina não centrifugada. A análise microscópica foi realizada na urina após centrifugação para quantificação de células epiteliais, cristais, leucócitos, hemácias, bactérias, filamento de muco e cilindros.

O presente estudo limitou-se por variáveis inerentes ao processo analítico. No entanto, estas limitações foram minimizadas realizando os testes em duplicata e utilizando soro controle como rastreamento de possíveis falhas analíticas e para obtenção de resultados consistentes.

### **Análise estatística**

Para o exame físico-químico da urina, elaborou-se uma escala de coloração expressa como: amarelo claro, amarelo, amarelo escuro e âmbar. Para análise estatística, essa escala foi substituída por números 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

Da mesma forma ocorreu com os resultados que expressam o aspecto da amostra (límpido, pouco turvo, turvo, muito turvo e leitoso), os quais foram substituídos por 0, 1, 2, 3 e 4 respectivamente. A análise química da urina foi

procedida pelo método semiquantitativo mediante reação com fita de polieletrólito (Combur Test Dade Behring®), sendo os resultados expressos por ausência, traços, 1, 2, 3 e 4 cruces. Estes então, foram substituídos por 0, 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente, exceto para valores de pH.

Os resultados dos parâmetros do exame microscópico do sedimento urinário foram expressos em número de estruturas observadas por campo de microscopia em 100X (células epiteliais, cristais, filamento de muco e cilindros) e 400X (hemácias, leucócitos e bactérias). No caso de células epiteliais, os resultados foram expressos como raras (0-4p/c), algumas (5-8 p/c), diversas (9-12 p/c) e numerosas (>13). Para análise dos resultados, atribuíram-se valores 1, 2,3 e 4 respectivamente para cada conceito. Para análise quantitativa de filamento de muco, os conceitos: ausente, pequena, moderada e grande quantidade foram substituídas por 0, 1, 2 e 3.

Foram analisados três tipos de cristais: urato amorfo, oxalato de cálcio e ácido úrico. Para estes foram usados os conceitos: ausência, pequena, moderada e grande quantidade, e também substituídos por números 0, 1, 2 e 3 respectivamente.

Os dados foram testados quanto a sua normalidade mediante análise de Kolmogorof-Smirnoff. A seguir, os resultados foram analisados estatisticamente por comparação de médias utilizando o teste “t” de Student para amostras pareadas (dados paramétricos) e teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (dados não-paramétricos) no pacote estatístico do SPSS 13.0 considerando  $p < 0,05$  como nível mínimo de significância. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## **RESULTADOS**

A tabela 1 apresenta a caracterização antropométrica e status de performance física dos atletas

### **INCLUIR TABELA 1**

A tabela 2 mostra os resultados dos parâmetros bioquímicos dos atletas em repouso e 15 minutos após o término da prova. Em comparação com os valores basais, os resultados mostram um aumento significativo na concentração sérica de HDL, creatinina, CK total e frações MM e MB, ferro sérico. Por outro lado, mostram também uma diminuição significativa na concentração de triglicérides, colesterol LDL, ácido úrico sérico ( $p < 0,05$ ).

### **INCLUIR TABELA 2**

A análise hematológica (tabela 3) mostra uma elevação na contagem de leucócitos, monócitos e neutrófilos, acompanhada de uma redução da contagem de linfócitos e eosinófilos ( $p < 0,05$ ) após a prova.

### **INCLUIR TABELA 3**

A análise dos resultados de parâmetros urinários (tabela 4) mostrou uma elevação significativa na concentração de ácido úrico e cilindros ( $p < 0,05$ ).

## **INCLUIR TABELA 4**

A análise estatística para dados não-paramétricos demonstrada na tabela 5, aponta um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) para a presença de filamento de muco, turvação, sangue e proteínas totais na urina.

## **INCLUIR TABELA 5**

### **DISCUSSÃO**

O exercício físico extenuante pode causar uma sobrecarga nos músculos. Por exigir uma força excessivamente maior que a necessidade habitual, os sistemas contráteis podem romper-se estruturalmente (6,13-17). Em consequência, uma maior infiltração de neutrófilos é evidenciada, com subsequente liberação de proteínas celulares para a circulação, como por exemplo, a creatina quinase (13-17). Desta forma, o aumento da atividade plasmática de enzimas musculares como: lactato desidrogenase (LDH), CK total e frações, pode ser uma resposta fisiológica típica diante exercícios físicos intensos e que geralmente podem ser usados como marcadores de lesão muscular (13-19). O pico de atividade destas enzimas ocorre dentro de 12-24 horas, no entanto, o foco deste estudo foi analisar as adaptações agudas que ocorrem num período inferior a 15 minutos.

Estudos prévios realizados em maratonistas por França, *et al* (2006), mostram uma elevação de 110% na atividade de CK total, 30-40% na LDH e 40% para CK-MB 24h às 60h após uma prova de maratona ou outro tipo de prática esportiva de elite (6, 13-19). Estes resultados corroboram os achados do presente estudo que apontaram um aumento de aproximadamente 120% para CK-total, 180% para CK-

mm; 85% para CK-mb e 50% para LDH. Mostrando que uma análise aguda de amostras biológicas pode contribuir significativamente para o diagnóstico de modificações bioquímicas induzidas pelo esporte.

Na medicina esportiva, a atividade da enzima CK total no soro é considerada como um importante marcador de lesão muscular, no entanto, seu valor isolado como marcador é questionável, uma vez que é um parâmetro bastante indireto e pouco-específico. Além disso, variações na atividade da CK diferem marcadamente de acordo com as condições de realização do exercício, carga de esforço, intensidade, duração, bem como do histórico de treinamento dos atletas e de características físicas individuais (13-19). O dano muscular causado pelo exercício é caracterizado por diminuição na produção de força muscular, aumento da atividade sérica da CK, rompimento de fibras musculares, inflamação e aumento na atividade de enzimas proteolíticas. Se a carga de exercício for repetida ao longo do tempo, o dano muscular é reduzido e o atleta desenvolve uma adaptação dos músculos esqueléticos, caracterizada por uma redução na liberação de CK para a corrente circulatória. A análise estatística dos resultados da atividade da CK-MM mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) 15 minutos após a meia-maratona. A liberação de CK-MM para a corrente circulatória é mais específica de sobrecarga muscular, quando comparada com a CK total (13-19).

A análise estatística da atividade da CK-MB mostrou um significativo aumento ( $p < 0,05$ ) em sua atividade. O diagnóstico de dano cardíaco em maratonistas é complexo, pois a elevação da atividade da CK-MB também ocorre em corredores assintomáticos e que apresentam exames cardiológicos normais após a corrida. Este aumento pode ser explicado pela ocorrência de uma lesão silenciosa do músculo esquelético que supera a liberação da CK-MB proveniente do coração (13-



20). O aumento na concentração sérica de CK-MB também pode acontecer pela ocorrência de formas atípicas de CK, como por exemplo, a macro-CK. A macro CK é um complexo formado por CK-BB ligada a imunoglobulinas (IgA, IgG) e a sua presença no soro dos atletas pode provocar uma aparente elevação na atividade de CK-MB.

Outra causa de elevação da CK é o microtrauma adaptativo, que é um tipo de lesão que faz parte integral do processo de adaptação a certos treinamentos ou uma consequência inevitável dos mesmos. Em atletas altamente treinados, o microtrauma adaptativo pode ser uma resposta constante, capaz de acelerar o *turnover* das fibras musculares. Diversas hipóteses foram estabelecidas para explicar o microtrauma adaptativo, dentre elas pressupõe a ocorrência de uma sobrecarga metabólica, em que a necessidade por ATP se tornaria mais alta que sua taxa de produção; outra propõe que a lesão muscular pode ser causada por forças mecânicas, como as presentes na contração excêntrica, capazes de romper a arquitetura muscular; outra propõe a elevação de mediadores de inflamação e estresse oxidativo dentre outros (13-19). Assim, esses achados mostram que a análise de marcadores bioquímicos de lesão, inflamação e desempenho atlético deve ser analisada à luz de um contexto clínico do atleta, bem como o seu desempenho após uma competição ou sessão de treinamento. Uma interpretação criteriosa deve ser aplicada com intuito de evitar conclusões equivocadas acerca de uma condição típica de esforço, quando comparada com uma condição patológica.

Brites *et al* (2004), mostraram que o exercício físico aeróbico está associado com um perfil lipídico menos aterogênico e com um risco cardiovascular reduzido. Durante um treino de resistência, a lipase lipoprotéica exerce função regulatória induzindo uma modificação e redistribuição intermolecular do colesterol e suas

subfrações, com aumento do HDL-C, que é compatível com os resultados encontrados no presente estudo (22-25). A análise estatística dos resultados mostra um aumento médio de 10,6% na concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL), com concomitante redução nos níveis de triglicérides (23%), LDL (40%) e VLDL (30%). Essas variações são condizentes com resultados obtidos na literatura, os quais mostram uma melhora no lipidograma, imediatamente após a realização de maratona e na realização de outros exercícios físicos aeróbicos intensos (21-27).

Considerando que a população analisada era sadia e isenta de problemas renais, a determinação da concentração de creatinina urinária pode servir como uma medida indireta da atividade do sistema fosfagênio. A análise estatística dos resultados mostra que não houve diferença significativa na concentração de creatinina urinária após a meia maratona ( $p=0,39$ ). Por outro lado, a concentração de creatinina plasmática apresentou um aumento significativo após o exercício físico ( $p<0,05$ ). Alguns momentos da prova de meia maratona são caracterizados por um aumento na intensidade de contração muscular e da velocidade, ocorrendo um maior recrutamento de fibras musculares do tipo II, além das fibras musculares do tipo I. Apesar das fibras de tipo II possuírem pouca mitocôndria e pequeno suprimento capilar, possuem um maior reservatório de glicogênio e fosfocreatina se comparadas com as fibras musculares de tipo I. Assim, por estratégia do atleta, se algum momento da meia maratona ocorrer um sprint, haverá a necessidade de obtenção de energia a partir da contração muscular rápida por parte da fibra de tipo II. Como consequência, poderá haver uma mobilização das reservas de fosfocreatina para a regeneração de ATP, resultando numa elevação dos níveis séricos de creatinina. Isso indica que em decorrência do esforço aplicado ser essencialmente aeróbico, o

sistema fosfagênio é poupado durante a prova e recrutado com maior intensidade em algumas etapas do percurso.

Diversos estudos demonstraram o aumento na concentração sérica de ácido úrico após a realização de exercício físico extenuante (4, 28-30), embora Robertson *et al* (1991) tenham observado uma redução nos níveis séricos de ácido úrico depois de uma sessão de exercício físico intenso. O ácido úrico plasmático pode neutralizar radicais peróxil na fase aquosa e contribuir com a defesa antioxidante plasmática. A conversão de hipoxantina em xantina/ácido úrico é catalisada pela xantina oxidase e está associada à formação de íon superóxido, oriundo da Ubequinona da cadeia de transporte de elétrons (12, 28, 30). A análise estatística dos resultados mostra uma redução significativa na concentração de ácido úrico sérico após a meia maratona ( $p < 0,05$ ). Especula-se que a ocorrência dessa hipouricemia pode estar relacionada com um aumento da atividade antioxidante (scavenger) do ácido úrico ou com a renovação de ATP através da via glicolítica aeróbica, a qual não permite o catabolismo de ATP para formação de ácido úrico. Por outro lado, a concentração de ácido úrico urinário apresentou um aumento significativo após o exercício ( $p < 0,05$ ), corroborando que o decréscimo da concentração plasmática pode estar associada a uma maior excreção urinária.

A análise dos resultados do exame físico da urina mostra que a turbidez apresentou um aumento significativo quando comparado com o repouso ( $p=0,008$ ). A perda hídrica não renal (transpiração e evaporação) pode alterar a relação soluto/solvente da urina, excretando uma amostra mais concentrada. Apesar disso, a medida da densidade urinária não apresentou diferença significativa ( $p= 0,11$ ), indicando que a reabsorção de solutos encontrava-se dentro da normalidade (31). A perda hídrica não renal e modificações eletrolíticas são sensivelmente modificadas

pelas condições climáticas. A temperatura no dia da prova era de 5°C o que pode ter contribuído para minimizar as perdas hídricas não renais que poderiam ser mais exuberantes num dia quente.

Os resultados do exame químico mostram um aumento significativo na proteinúria ( $p < 0,001$ ), cilindrúria ( $p = 0,004$ ) e muco ( $p < 0,001$ ) após esforço. A causa primária destas alterações pode estar relacionada com a atividade física intensa que provoca um variável grau de desidratação, estresse ou distúrbios glomerulares, tubulares e hiperfiltração. Além do aumento da pressão hidrostática durante o exercício, outras causas da elevação de proteínas na urina são: lesão, luxação ou ruptura muscular ocorrida durante a prática desportiva, já que no local da lesão podem ser liberadas proteínas constituintes do tecido local lesado (7, 8, 26, 31). A presença de filamento de muco e cilindros é decorrente da geleificação da proteína de Tamm Horsfall produzida pelo túbulo renal em condições de estase renal. O aumento da perda hídrica não-renal por evaporação e sudorese promove uma diminuição no fluxo urinário que resulta na formação de cilindros. A quantidade de cilindros geralmente é proporcional à estase urinária e a desidratação (31). A cilindrúria apresentada concorda com os resultados obtidos por Fasset *et al* (1982). Os cilindros do presente estudo apresentaram-se estreitos e curtos, por formação provavelmente no túbulo distal. Esta estase urinária apresentada afastaria a possibilidade de dano glomerular, uma vez que é possível acontecer uma proteinúria transitória como a pseudoanefrite atlética (7, 8, 32).

Os resultados também mostram um aumento significativo na presença de sangue na urina ( $p = 0,006$ ), mas não apresentou diferença na análise microscópica de hemácias ( $p = 0,06$ ). Além disso, a concentração de ferro sérico livre mostrou uma elevação significativa ( $p = 0,028$ ), sendo que este achado pode ser indicativo de

hemólise. Exercícios físicos extenuantes podem produzir hemoglobinúria assintomática, onde a hemólise pode ser decorrente do impacto dos pés no solo, aumento da força de cisalhamento do sangue periférico nas paredes dos vasos, decréscimo da concentração de óxido nítrico, bem como estresse oxidativo (12, 20, 33, 34, 35). Por outro lado, os resultados de bilirrubina e urobilinogênio urinário após o esforço, não mostraram diferença significativa. De fato, o aumento na destruição eritrocitária produz uma bilirrubinúria tardia, uma vez que esta bilirrubina oriunda da hemólise está na forma não-conjugada (apolar), não sendo excretada pelos rins. Além disso, o urobilinogênio é um pigmento resultante da degradação da bilirrubina conjugada pelas bactérias intestinais, que posteriormente é reabsorvido e filtrado pelos rins. Como este processo pode levar até 24 horas, não foi possível detectar na urina 15 minutos após a prova conforme a proposta do estudo.

A análise aguda do eritrograma (eritrometria, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM) não mostrou diferença significativa. O treino de resistência pode provocar uma expansão volêmica aguda, o que justificaria uma queda na concentração de hemoglobina nos atletas. Nestes casos, ocorre um fenômeno reacional e transitório chamado de pseudoanemia dilucional (11, 33, 34), o que não foi o caso. A análise da concentração de ferro sérico e do índice de saturação da transferrina mostrou uma significativa elevação após a prova ( $p < 0,05$ ). A hiperatividade da cadeia de transporte de elétrons (rica em citocromos), aliada a um variável grau de hemólise, pode promover um extravasamento de proteínas ricas em ferro. Por outro lado, comparando estes resultados com a população em geral, encontrou-se valores abaixo da normalidade tanto em repouso, como após a meia maratona.

Segundo Mateo e Laínez, (2000) indivíduos com valores de hemoglobina dentro da faixa de normalidade, com progressiva redução de ferro sérico (inferior a 60µg/dl); aumento da transferrina sérica e redução do percentual de saturação da transferrina (abaixo de 16%), podem estar relacionados com a primeira fase de instalação de um processo anêmico. A fase seguinte se caracterizará por reduções importantes da hemoglobina, hematócrito e da eritrometria. Isto sugere que mesmo com níveis normais de hemoglobina, os atletas analisados já apresentam um balanço negativo de ferro, caracterizando uma anemia do atleta e não um quadro de hemodiluição. Este déficit poderá comprometer o transporte de oxigênio e desencadeando uma perda de rendimento atlético nos indivíduos analisados.

Altitudes superiores a 1500m promove uma maior liberação de eritropoietina que por sua vez eleva a contagem de eritrócitos e conseqüentemente de hemoglobina. A meia maratona foi realizada a 600m do nível do mar. É pouco provável que este fator tenha influenciado diretamente nos resultados. No entanto, faz-se necessária a realização de novos estudos e que estes resultados possam ser comparados com outras provas realizadas ao nível do mar. Independentemente disso, fica clara a necessidade de uma prescrição nutricional adequada, por profissionais capacitados, para suprir as necessidades aumentadas da população analisada.

Análise dos resultados do leucograma mostrou um incremento de aproximadamente 100% na leucometria pós-esforço ( $p < 0,001$ ), caracterizada por uma neutrofilia e monocitose. A leucocitose pós-atividade ocorre possivelmente porque os leucócitos constituem a primeira linha de defesa do organismo diante do estresse físico e ao possível trauma provocado pelo exercício. Esta elevação pode ocorrer em resposta a um aumento na secreção de proteínas de fase aguda,

mediadores de resposta inflamatória, catecolaminas, cortisol, hormônio do crescimento (GH), peptídeos opióides (endorfinas), interferons, interleucinas e fatores de necrose tumoral (20, 27, 34, 36, 37).

Considerando o tipo de esforço realizado pelos fundistas durante o percurso de 21km, a utilização de um grupo controle composto por pessoas não-atletas torna-se inviável em decorrência de um metabolismo atlético totalmente adaptado a condições extremas de treinamento. Ainda, identificar destaques numa população participante como forma de controlar a variável “tempo de coleta pré e pós-esforço”; contar com o aceite em participar do estudo e reconhecê-los dentro de uma multidão participante, restringiu a amostra a apenas 20 atletas. O número limitado da amostra não é apropriado para adoção de valores de referência conclusivos para atletismo, mas contribui para análises sistemáticas de atletas fundistas em situações semelhantes de treino/competição como forma de diferenciação de alterações fisiológicas e patológicas nas condições propostas. A realização de estudos com dosagem de eritropoietina e ferritina poderão auxiliar na distinção de um quadro de hemodiluição, anemia do atleta e hipoferrêmia.

## **CONCLUSÃO**

A realização da meia maratona nas condições propostas promoveu uma elevação na atividade de enzimas marcadoras de dano muscular 15 minutos após a prova, podendo ser aplicada com uma boa confiabilidade. A elevação registrada sugere uma microlesão silenciosa oriunda de um variável grau de rompimento de fibras musculares. Além disso, apesar dos valores de hemoglobina normal, a hipoferrêmia apresentada pelos atletas indica a instalação de um processo anêmico que poderia evoluir a uma queda nos valores eritrocíticos com subsequente perda de rendimento atlético decorrente de uma oxigenação muscular insatisfatória.

Os resultados do presente estudo permitiram o acompanhamento sistemático dos atletas participantes no monitoramento de lesões silenciosas, rastreamento da anemia do atleta. Além disso, a análise conjunta de dados clínicos dos atletas obtidas com o corpo clínico (médico fisiologista, fisioterapeuta, treinadores), permitiu identificar sinais de desgaste físico como forma de prevenção de perda de rendimento atlético da população analisada. No entanto, os resultados aqui expostos devem ser analisados sob um contexto clínico e jamais analisados como dados numéricos e analisados como valores de referência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Prof. Dr. Hugo Tourinho Filho pelas sugestões e revisão ao manuscrito.



## BIBLIOGRAFIA

1. Monteiro WD, Araújo CGS. Transição caminhada-corrída: considerações fisiológicas e perspectivas para estudos futuros. Rev Bras Med Esporte. 2001;7(6): 207-22.
2. Strachan AF, Noakes TD, Kotzenberg G, Nel AE, de Beer FC. C-reactive protein concentrations during long-distance running. Br Med J. 1984; 289:1249-1251.
3. Febbraio MK, Dancy J. Skeletal muscle energy metabolism during prolonged, fatiguing exercise. J Appl physiol. 1999; 87 (6): 2341-2347.
4. De Feo P, Di Loreto C, Lucidi P, Murolo G, Parlanti N, De Cicco A, Piccioni F, Santeusanio F. Metabolic response to exercise. J Endocrinol Invest. 2003; 26: 851-854.
5. Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. Am J Phys Med Rehabil. 2002; 81: S52–S69.
6. Apple FS, Rogers MA, Ivy JL. Creatine kinase isoenzyme MM variants in skeletal muscle and plasma from marathon runners. Clin Chem. 1986; 32(1): 41-44.

7. Egermann M, Brocai D, Lill CA, Schmitt H. Analysis of injuries in long-distance triathletes. *Int J Sports Med.* 2003; 24: 271–276.
8. Bassit RA, Curi R, Costa Rosa LFBP. Creatine supplementation reduces plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition. *Amino Acids.* 2008; 35(2):425-31.
9. Totsuka M, Nakaji S, Suzuki K, Sugawara K, Sato K. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. *J Appl Physiol* 2002; 93: 1280-1286.
10. Yuu H, Ishizawa S, Takagi Y, Gomi K, Senju O, Ishii T. Macro creatine kinase: a study on CK-linked immunoglobulin. *Clin Chem.* 1980; 26(13):1816-1820.
11. Fogazzi G, Grignani S. Urine microscopic analysis - an art abandoned by nephrologists?. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998; 13(10): 2485-2487.
12. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berensshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 5119-5123.
13. Echegaray M, Rivera MA. Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and cardiorespiratory endurance. Genetic and molecular evidence. *Sports Med.* 2001; 31(13): 919-934.

14. Siegel AJ, Sholar M, Yang J, Dhanak E, Lewandrowski KB. Elevated serum cardiac markers in asymptomatic marathon runners after competition: is the myocardium stunned? *Cardiology*. 1997; 88(6): 487-91.
15. Siegel AJ, Lewandrowski KB, Strauss HW, Fischman AJ, Yasuda T. Normal post-race antimyosin myocardial scintigraphy in asymptomatic marathon runners with elevated serum creatine kinase MB isoenzyme and troponin T levels. Evidence against silent myocardial cell necrosis. *Cardiology*. 1995; 86(6): 451-6.
16. Kratz A, Lewandrowski KB, Siegel AJ, Chun KY, Flood JG, Cott EV. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. *Am J Clin Pathol*. 2002; 118(6): 856-863.
17. Brites F, Verona J, De Geitere C, Fruchart, JC, Castro G, Wikinski R. Enhanced cholesterol efflux promotion in well-trained soccer players. *Metabolism*. 2004; 53(10): 1262-1267.
18. Bounds RG, Grandjean PW, O'Brien BC, Inman C, Crouse SF. Diet and short term plasma lipoprotein-lipid changes after exercise in trained Men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2000; 10 (2): 114-27.
19. França SCA, Neto TLB, Agresta MC, Lotufo RFM, Kater CE. Resposta divergente da testosterona e do cortisol séricos em atletas masculinos após

uma corrida de maratona. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006, 50(6): 1082-1086

20. Bounds RG, Grandjean PW, O'Brien BC, Inman C, Crouse SF. Diet and short term plasma lipoprotein-lipid changes after exercise in trained Men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2000; 10(2): 114-127.

21. Sunami Y, Motoyama M, Kinoshita F, Mizooka Y, Sueta K, Matsunaga A, Sasaki J, Tanaka H, Shindo M. Effects of low-intensity aerobic training on the high-density lipoprotein cholesterol concentration in healthy elderly subjects. *Metabolism.* 1999; 48(8): 984-8.

22. Hellsten WY, Balson PD, Norman B, Sjodin B. The effect of high-intensity training on purine metabolism in man. *Acta Physiol Scand.* 1993; 149: 405-412.

23. Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci.* 1991; 80: 611-618.

24. Woitge HW, Friedmann B, Suttner S, Farahmand I, Muller M, Schmidt-Gayk H. Changes in bone turnover induced by aerobic and anaerobic exercise in young males. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(12): 1797-1804.

25. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36: 1329-1341.
26. Farber HW, Schaefer EJ, Franey R, Grimaldi R, Hill HS. The endurance triathlon: metabolic changes after each event and during recovery. *Med Sci Sports Exerc.* 1991; 23: 959–965.
27. Pedersen BP, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000; 80: 1055–1081.
28. Santos RVT, Bassit RA, Caperuto EC, Costa Rosa LFBP. The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30 km race. *Life Sci.* 2004; 75: 1917–1924.
29. Fallon KE, Fallon SK, Boston T. The acute phase response and exercise: court and field sports. *Br J Sports Med.* 2001; 35: 170-173.
30. Landray MJ, Sagar G, Muskin J, Murray S, Holder RL, Lip GYH. Association Of Atherogenic Low-Density Lipoprotein Subfractions With Carotid Atherosclerosis. *Q J Med.* 1998; 91: 345–351.
31. Noakes TD. Effect of exercise on serum enzyme activities in human. *Sports Med.* 1987; 4: 245-267.

32. Hansen KN, Bjerre-Knudsen J, Brodthagen U, Jordal R, Paulev PE. Muscle cell leakage due to long distance running. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1982; 48(2): 177-188.
33. Brahm H, Piehl-Aulin K, Ljunghall S. Bone metabolism during exercise and recovery: the influence of plasma volume and physical fitness. *Cal Tissue Int.* 1997; 61(3): 192-198.
34. Welsh L, Rutherford OM, James I, Crowley C, Comer M, Wolman R. The acute effects of exercise on bone turnover. *Int J Sports Med.* 1997; 18(4): 247-251.
35. Mastaloudis, A. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(10): 1329-1341.
36. Mateo RJN, Laínez MGL. Anemia do atleta: fisiopatologia do ferro. *Rev Bras Med Esporte.* 2000; 6(3): 108-114.
37. Bonsignore MR, Morici G, Santoro A. Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. *J Appl Physiol.* 2002; 12(93): 1691–1697.

38. Cannon JG, Fielding RA, Fiatarone MA, Orencole SF, Dinarello CA and Evans WJ. Increased. Interleukin 1 beta in human skeletal muscle after exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1989;257: 451-455.
39. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: factor fiction? *Acta Physiol Scand.* 2001; 171: 233–239
40. Noakes, T.D; Carter, J.W. The responses plasma biochemical parameters to a 56-km race in novice and experienced ultramarathon runners. *Eur J Appl Physiol.* 1982; 49:179-186.

**TABELA 1:** Caracterização antropométrica e status de performance física dos atletas, Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

Variável	Caracterização
"n" amostral	20 atletas
gênero	Masculino
idade	35,5 $\pm$ 10 anos de idade
Altura	174 $\pm$ 6cm altura
Peso	63,3 $\pm$ 6,3 Kg
Índice de Massa Corpórea (IMC)	21 $\pm$ 1,2 Kg/m <sup>2</sup>
Tempo de treinamento	13,2 $\pm$ 7 anos



**TABELA 2:** Análise de parâmetros bioquímicos de maratonistas profissionais em repouso e 15 minutos após realização de meia maratona. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*p < 0,05 em relação ao repouso pela análise do teste de T de Student para amostras pareadas.

	Repouso	Após esforço	P
Triglicerídeos (mg/dl)	85,8 $\pm$ 8,4	69,1 $\pm$ 5,2	0,04*
Colesterol LDL (mg/dl)	155,4 $\pm$ 10,4	110 $\pm$ 11,1	0,03*
Colesterol HDL (mg/dl)	42,9 $\pm$ 1,3	47 $\pm$ 2,7	0,001*
Ácido úrico Sérico (mg/dl)	4,97 $\pm$ 1,7	3,51 $\pm$ 1,2	0,005*
Creatinina Sérica (mg/dl)	0,85 $\pm$ 0,18	1,14 $\pm$ 0,17	0,04*
Creatina quinase total sérica (U/l)	84,9 $\pm$ 48,1	198,2 $\pm$ 163,9	0,01*
Creatina quinase mm sérica (U/l)	58,3 $\pm$ 39,4	164,1 $\pm$ 153,2	0,03*
Creatina quinase mb sérica (U/l)	28,8 $\pm$ 12,4	44,7 $\pm$ 17,0	0,04*
Relação creatina quinase mb/creatina quinase total	33,9 $\pm$ 25	22,5 $\pm$ 4,2	0,02*
Ferro sérico ( $\mu$ g/dL)	19,5 $\pm$ 3,7	23,9 $\pm$ 2,0	0,02*
IST (índice de saturação da transferrina) (%)	5,7 $\pm$ 1,3	7,6 $\pm$ 1,4	0,02*

**Valores de referência** (população sadia):

Ferro ( $\mu$ g/dL): 65 – 170  $\mu$ g/dl

IST (índice de saturação da transferrina) (%): 20 – 55%

**TABELA 3:** Análise de parâmetros hematológicos de maratonistas profissionais em repouso e 15 minutos após realização de meia maratona. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*p < 0,05 em relação ao repouso pela análise do teste de T de Student para amostras pareadas.

	Repouso	Após esforço	P
Leucometria (cels/ul)	6.300 $\pm$ 227	13.800 $\pm$ 818	<0,0001*
Monócitos (ul)	323,4 $\pm$ 59	476,2 $\pm$ 56,8	0,04*
Linfócitos (%)	32,9 $\pm$ 2,7	21 $\pm$ 2,2	0,001*
Linfócitos (ul)	2056,4 $\pm$ 192	2932 $\pm$ 406	0,03*
Eosinófilos (%)	2,3 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,2	0,02*
Neutrófilos Segmentados (%)	49,5 $\pm$ 3,4	59,8 $\pm$ 2,2	0,01*
Neutrófilos Segmentados (ul)	2932,6 $\pm$ 270	8323,8 $\pm$ 607	<0,0001*
Neutrófilos Bastonetes (%)	4,3 $\pm$ 0,8	13,9 $\pm$ 1,4	<0,0001*
Neutrófilos Bastonetes (ul)	398,2 $\pm$ 135	1952 $\pm$ 262	<0,0001*
Plaquetas (ul)	239,2 $\pm$ 12	287,7 $\pm$ 11	0,04*

**TABELA 4:** Análise de parâmetros urinários de maratonistas profissionais em repouso e 15 minutos após realização de meia maratona. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*p < 0,05 em relação ao repouso pela análise do teste de T de Student para amostras pareadas.

	Repouso	Após esforço	P
Cilindros urinários (min)	0,0 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 11,8	0,004*
Cilindros urinários (máx)	0,0 $\pm$ 0,0	17 $\pm$ 21	0,002*
Leucócitos urinários (min)	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 1,9	0,05*
Leucócitos urinários (max)	2,0 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 6,8	0,002*
Creatinina urinária (mg/creatinina)	75,2 $\pm$ 51,9	79,8 $\pm$ 49,8	0,39
Ácido úrico urinário (mg/mg de creatinina)	0,3+0,289	0,58+0,67	0,03*

**TABELA 5:** Análise de parâmetros urinários de maratonistas profissionais em repouso e 15 minutos após realização de meia maratona. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*p < 0,05 em relação ao repouso pela análise do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para dados não-paramétricos

	Repouso	Após esforço	P
Cristais urato amorfo	1,0 $\pm$ 1,4	0,4 $\pm$ 0,9	0,01*
Densidade	1.019 $\pm$ 0,008	1.015 $\pm$ 0,006	0,11
Filamento de muco	0,1 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 1,3	< 0,001*
Aspecto/turbidez	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 1,0	0,008*
Urobilinogênio	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	NS
Bilirrubina	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	NS
Sangue	0,2 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 2,1	0,006*
Proteínas	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,8	< 0,001*

Capítulo II:

**Serum and urine analysis of biochemical markers of proteolysis, lipolysis, hemolysis, and muscle injury in Brazilian futsal players during training**

Periódico: Revista Brasileira de Medicina do Esporte

Status: Submetido

**Serum and urine analysis of biochemical markers of proteolysis, lipolysis, hemolysis, and muscle injury in professional futsal players during training.**

Análise sérica e urinária de marcadores bioquímicos de proteólise, lipólise, hemólise e dano muscular em atletas profissionais de FUTSAL durante sessão de treinamento

Luciano de O. Siqueira<sup>1</sup>, Daniel Schwarzbach<sup>1</sup>; Lucas Marostica<sup>1</sup>; José Cláudio F. Moreira<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões/ Centro de Ciências da Saúde/ Curso de Farmácia

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Centro de Ciências Básicas da Saúde/ Departamento de Bioquímica

Autor: Luciano de Oliveira Siqueira

Universidade Regional Integrada – Campus Erechim

Centro de Ciências da Saúde

Curso de Farmácia e Bioquímica

Av. 7 de Setembro 1921 – Erechim – RS

E-mail: lsiqueirabr@yahoo.com.br

## Resumo

As respostas bioquímicas induzidas pelo exercício físico têm sido amplamente estudadas pela comunidade científica, a fim de não só compreender os efeitos bioquímicos do desporto, mas também para a obtenção de resultados cada vez mais competitivos. O objetivo deste estudo foi avaliar a o metabolismo de proteínas, lipídios no sangue e urina de 12 atletas profissionais que participam na série Ouro da liga de Futsal. Os 12 atletas ( $25,5 \pm 4,8$  anos,  $170 \pm 4$  cm de altura,  $74,6 \pm 7,6$  kg, IMC  $24,2 \pm 1,9$  Kg/m<sup>2</sup>) foram submetidos a um protocolo padrão treinamento da equipe. Amostras de sangue e urina dos atletas foram coletadas em repouso e 15 minutos após a sessão de treinamento. A análise estatística dos resultados mostra um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas contagens relativa (células /%) e absoluta (células/ $\mu$ L) de neutrófilos, bem como na concentração sérica de ácido úrico, colesterol total e frações HDL, ALT, LDH e CK-MM. Por outro lado, apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração de magnésio, glicose, uréia urinária, contagem relativa de linfócitos; contagem absoluta de monócitos e eosinófilos (células /% e células /  $\mu$ L). Os resultados aqui obtidos permitem concluir que a compreensão bioquímica das adaptações metabólicas induzidas pelo esporte podem minimizar o dano muscular, aperfeiçoar o desempenho atlético e elaborar protocolos mais adequados.

Palavras-chave: lesão, hemólise e futsal

## **Abstract**

Physical exercise has been widely studied by the scientific community in order to not only understand the biochemical effects of sport, but also for obtaining increasingly better results. The purpose of this study was to evaluate protein, lipid, blood and urine metabolisms of 12 professional athletes taking part in the Gold match series of the Brazilian Futsal League (futsal) ( $25.5 \pm 4.8$  years old;  $170 \pm 4$  cm height;  $74.6 \pm 7.6$  kg; BMI  $24.2 \pm 1.9$  Kg/m<sup>2</sup>) submitted to a specific training protocol. Blood and urine samples were collected from the athletes at rest and 15 minutes after each training session. The statistical analysis of results shows an increase ( $p < 0,05$ ) in relative (cells/%) and absolute (cells/ $\mu$ L) counts of segmented neutrophils, serum uric acid concentration, total cholesterol and HDL fraction, ALT, LDH and CK-MM activity in serum, associated with a statistically significant decrease ( $p < 0,05$ ) in magnesium concentration, glucose, urinary urea, relative lymphocyte count; absolute monocyte count, and relative and absolute eosinophil count (cells/% and cells/ $\mu$ L). Results obtained herein allow us to conclude that understanding biochemical adaptation may minimize muscle damage, optimize athletic performance and offer training protocols more suited to each sport activity.

Keywords: athletes' injuries, hemolysis, Futsal.



## INTRODUCTION

During sport training there is an increase in basal metabolism activity, depending on the intensity and duration of training. During training, the athlete must keep its metabolism accelerated for a longer time in order to supply increased energy requirements (1-4).

Severe muscle glycogen depletion results in an increased rate of muscle proteolysis and amino acids oxidation (2-4). Proteolysis during exercise should be avoided since it may lead to muscle loss and, consequently, to loss of strength and athletic performance, besides an overload of the kidneys due to an increased excretion of nitrogen compounds (3-5).

During physical activity, the athlete is exposed to various blood-stress conditions, such as alteration of red blood cell mass (hemodilution, exercise hemolysis, hematury, blood loss through the gastrointestinal tract, alteration in erythrocyte shape, decrease in iron stores), increase in hematopoietic hormone release (cortisol and catecholamines); increase in the production of reactive oxygen species (ROS) (free radicals such as superoxide ion, hydroxyl, peroxide and singlet oxygen); adaptation of the immune system due to stress and traumatism from exercise, mimicking an inflammatory process (2,6,7).

It has been shown that many factors promote an increase in the activity of several serum enzymes during or after extenuating exercise. The anomalous results found in this study may be explained by the loss of proteins from muscle cells into the bloodstream of either healthy or trained people. Individuals showing an increased activity of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and aminotransferases (AST and ALT) usually also present high thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

concentration in plasma. This suggests a possible correlation between free radicals formation and muscle damage induced by exercise (7-12) .

Reference values of biochemical and blood parameters for athletes during training are still conflicting. Contributing to these difficulties are factors such as training length, time of season, type of effort, seasonality, and climatic conditions under which effort is made. Serial studies under controlled climatic conditions and training protocols might contribute to differentiate between typical biochemical alterations due to physical effort and pathological alterations.

Based on this, we aimed at analyzing the metabolism of professional athletes during training, assessing blood and urinary markers of proteolysis, lipolysis, hemolysis, and muscle microtrauma.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

Twelve male professional athletes competing during the first month of the Golden Series of the Brazilian League of Futsal participated in the study. The athletes were submitted to anamnesis consisting of a standard interview concerning the intake of drugs or supplements, time of training, height and weight. The athletes were in average  $25.5 \pm 4.8$  years old;  $170 \pm 4$  cm high; weighted  $74.6 \pm 7.6$  kg; and showed a BMI of  $24.2 \pm 1.9$  Kg/m<sup>2</sup>. They had been training for more than two years, using athletic shoes provided by the club's sponsoring company. The athletes were assessed after 72 hour of physical rest and 8 hour of fasting.

The sample comprised exclusively male professional athletes. All athletes were in optimal physical conditions and were not taking any drugs or supplements

that might interfere in the proposed analyses. All participants did not perform any extenuating physical activity in the 72 hours preceding the training.

The study protocol was previously submitted to and approved by the Research Ethics Committee of the University of Passo Fundo, according to the Brazilian National Health Council's regulation 196/1996. All athletes agreed to participate voluntarily in the study, after having been informed of its purposes and potential risks. An informed written consent according to the Nuremberg Code (1947), the Declaration of Human Rights (1948), and the Declaration of Helsinki was then signed.

**Environmental conditions:**

The training session was held in the morning in a sports hall and lasted approximately 90 minutes. The tests were performed at 15 °C room temperature, 88% of relative air humidity (rainy day) and 783 m above sea level. The athletes were dressed in light training outfit.

**Training protocol:**

The training protocol included approximately 90 minutes of physical activity, subdivided into three phases:

- a) 10 min of light jog
- b) 10 min of switching between a 10-sec sprint and a 20-sec jog
- c) 10 min of switching between a 30-sec sprint and a 90-sec light jog

After the aerobic training, the athletes performed 30 min of leg developing exercises, three sets of 12 repetitions each, with 45 sec interval for recovering between one machine and the next.

**Analytical protocol:****- Blood samples:**

Blood samples were aseptically collected from the antecubital fossa of athletes at rest and 15 minutes after the end of the training session.

A 2-mL blood sample was stored in flasks containing 2 mg/mL ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) for blood analysis. A complete blood count with platelets was performed by electronic impedance cell count ABX micros 60<sup>®</sup> (ABX diagnostics, Montpellier, France). A leukocyte differential count was performed by microscopic analysis of 200 cells (Nikon Eclipse 600<sup>®</sup>, Nikon Corporate Instruments, Japan) in blood slides stained by Romanowsky technique (Merck<sup>®</sup>). The differential analysis of cell strains was expressed in relative (cells/%) and absolute (cells/ $\mu$ L) counts.

For obtaining serum, 8 mL of the sample collected was stored in a test tube without anticoagulant. In the sequence, it was centrifuged at 1500 rpm for 15 minutes, serum was then extracted and placed into test tubes pre-treated with 30 % nitric acid for 24 hours, and rinsed five times with bidistilled water for spectrophotometrically measuring biochemical parameters such as calcium, phosphorus, magnesium, glucose, uric acid, creatinine, urea, total proteins, aminotransferases (ALT/AST) alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase (LDH), total creatine kinase, MB creatine kinase, triglycerides, total cholesterol and fractions were measured using by fully enzymatic methods a Labtest<sup>®</sup> Diagnostica S.A.(Belo Horizonte, Brazil) on a semi-automated equipment from Labquest<sup>®</sup> (Labtest<sup>®</sup> Diagnostica S.A., Belo Horizonte, Brazil). Sodium, potassium, and chlorides were

measured by the ion-selective electrode technique Medica EasyLite® (Medica Corporate Profile, Bedford, Massachusetts USA).

- Urine samples:

A midstream urine sample, with previous washing of the genitals, of approximately 20-50 mL was collected in universal collecting flasks, from athletes at rest and up to 15 minutes after the training session. The samples were placed in standard flasks, which were then transferred from the collecting site to the Pharmacy College lab under controlled temperature. The samples were immediately processed for microscopic and physical-chemical analysis of the sediment, as recommended by the ABNT-CB 36 (*in vitro*). They were centrifuged at 1800 rpm for 10 minutes, and 1 mL of the supernatant was harvested for later biochemical analysis of total urinary proteins, uric acid, creatinine and urea (Labtest® Diagnostica S.A.).

The physical-chemical analysis was performed by visual observation of urine appearance and color and the density was measured by manual refractometer (LF® Equipamentos hospitalares, São Paulo, Brazil).

The chemical analysis was performed with polyelectrolyte test strips (ComburTest Dade-Behring®), in order to determine proteins, glucose, nitrite, bilirubin, pH, ketones, leucocytes, blood and urobilinogen in the non-centrifuged urine sample.

The microscopic analysis analyzed urinary sediment for epithelial cells, crystals, leucocytes, erythrocytes, bacteria, mucous and cast.

### **Statistical analysis**

The data were assayed for normality by Kolmogorof-Smirnov test. Results were then statistically analyzed by comparing averages with Student's "t" test for matched samples (parametric data) and Wilcoxon-Mann-Whitney test (non parametric data) with the SPSS 13.0 statistical package, considering  $p < 0,05$  as minimum level of significance. Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

## **RESULTS**

Results in Table 1 show a statistically significant ( $p < 0,05$ ) increase in segmented neutrophils relative (cells/%) and absolute (cells/ $\mu\text{L}$ ) counts; and in uric acid serum concentration, total cholesterol, HDL cholesterol, ALT, LDH, CK-MM, associated with a statistically significant ( $p < 0,05$ ) decrease in magnesium, glucose, and urinary urea concentrations, in lymphocytes relative count (cells/%) ; in monocytes absolute count (cells/ $\mu\text{L}$ ), and in absolute and relative (cells/% and cells/ $\mu\text{L}$ ) eosinophils counts.

### **INSERT TABLE 1**

However, parameters such as red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, MCH, MCV, MCHC, platelets, white blood cell count, absolute lymphocytes count, absolute band neutrophils count, relative monocytes count, relative band neutrophils count, serum proteins, serum urea, serum and urinary creatinine, urinary uric acid, AST, serum calcium, LDL and VLDL cholesterol, serum chlorine, triglycerides, alkaline phosphatase, phosphorus, total creatine kinase and MB fraction, iron, and potassium, did not show any significant ( $> 0,05$ ) difference. Data not shown.

### **INSERT TABLE 2**

Table 2 shows a statistically significant ( $p < 0,05$ ) increase in mucous and cast, indicating a potential decrease in urinary flow due to non-renal water loss induced by sweating. And an increase in ketones in urine, indicating a lipolytic picture.

Conversely, results of non parametric data by the Wilcoxon-Mann-Whitney test of the physical-chemical analysis of urine, such as color, appearance (turbidity); density, reaction to leucocytes, urobilinogen, pH, red blood cells and hemoglobin,

bilirubin, glucose, as well as the microscopic analysis of epithelial cells, amorphous urates, uric acid crystals, and calcium oxalate crystals, did not evidence any significant ( $p>0,05$ ) difference. Data not shown.

## DISCUSSION

Analysis of bone metabolism (alkaline phosphatase, calcium and phosphorous activities) of the athletes agrees with studies by Febbraio *et al* (13), Brahm *et al* (14), Woitge *et al* (15) and Clarkson *et al* (16), which showed that there was no statistically significant ( $p>0,05$ ) difference when athletes were submitted to a strength training protocol. While aerobic training leads to changes compatible with a reduction in bone resorption activity, anaerobic training seems to result in a fast increase in bone turnover, thus confirming the trend of increased alkaline phosphatase activity found in the present study when comparing results at rest and after effort. Therefore, the impact of physical activity on bone turnover may depend on the type and intensity of the exercise performed (12-16).

Table 1 shows a statistically significant ( $p<0.01$ ) decrease in magnesium concentration. The decrease in serum magnesium levels is probably due to an increase in bone formation, but mainly due to an increase in enzyme activity of the glycolytic pathway, since magnesium is an important co-factor for most enzymes that participate in glycolysis. It is believed that participating in the glycolytic pathway contributes to a greater decrease in serum magnesium when compared to bone formation, since calcium – the major mineral component of bone – and alkaline phosphatase activity levels, implicated in osteoblastic activity, did not vary significantly ( $p>0,05$ ). The discrepancy between the positive and negative effects on bone metabolism results from the lack of a specific laboratory marker for bone



metabolism. Thus, the actual understanding of bone metabolism remains obscure. Future studies—with specific markers for bone function—could explain the actual influence of physical exercise on bone metabolism of top athletes.

Lipid profile readings showed that total cholesterol and HDL-cholesterol had a significant ( $p < 0.01$ ) increase after training. The higher HDL fraction may be a result of the increase in LCAT activity and in ApoA-I in plasma. On the other hand, LDL-C did not show any statistical difference after the training, but it should be noted that the decrease in LDL did not occur acutely, i.e. right after exercise, but rather slowly and gradually, since the steroid ring of cholesterol does not allow oxidation to  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$ . On the other hand, since soccer involves type I and II muscle fibers, it does not develop an intense lipolysis process, although it is sufficient to improve the HDL/LDL ratio (9).

Clarkson and Tremblay (16) suggested that creatine kinase release after eccentric exercise may occur due to cell necrosis. The analysis of results showed that although athletes had been resting for 72 hours before training, total creatine kinase and CK-MM serum levels were above reference values for healthy individuals (25-130 UI/L). This strongly suggests that the training protocol adopted by the team might be eliciting an overload and, consequently, loss of both muscle and athletic performance. However, considering that creatine kinase circulating in plasma may reflect its release from muscle fibers and its clearance from circulation, this parameter should be assessed very carefully (16,17).

Results obtained herein show a significant ( $p < 0.001$ ) increase in plasmatic activity of lactate dehydrogenase when compared with values at rest. These results agree with those obtained by Kanter *et al* (18), Siegel *et al* (11). As other intracellular enzymes, lactate dehydrogenase (LDH) is a cytoplasmic enzyme and the increase of

its plasmatic activity may be more related to lesions in skeletal muscles from rupture of muscle fibers than to hemolysis, since hemoglobin, RBC count, serum hematocrit, bilirubin, and serum and urinary urobilinogen parameters did not show any significant ( $p>0,05$ ) variation.

On the other hand, increase of LDH serum activity associated with an increase in CK-MM activity may be due to adaptive microtrauma (11,16,17). This kind of lesion is an integral part of the adaptation process to certain types of training or an inevitable consequence of the same (16,17). In highly trained athletes, adaptive microtrauma can be a continuous response capable of accelerating muscle fiber turnover. Two hypotheses were established to explain the adaptive microtrauma. One assumes that there is a metabolic overload, where ATP requirements would be higher than its production rate, while the other assumes that muscle lesion is caused by mechanical forces, such as those in eccentric contractions, capable of disrupting muscle architecture, which, in the present study, is implicated in exercises for muscle development in fitness center (11, 13, 16,17).

The analysis of alanine aminotransferase (ALT) activity in plasma showed a statistically significant increase when compared to results obtained at rest ( $p<0.001$ ). On the other hand, the analysis of aspartate aminotransferase (AST) plasmatic activity did not show any change ( $p>0,05$ ). ALT activity in plasma can also increase when there is depletion of muscle glycogen stores, as observed in prolonged exercises requiring additional substrate to be used during muscle contraction. Similarly as skeletal muscle, the liver also has limited glycogen stores, and when these decrease, it must produce glucose from other sources besides glycogen, thus increasing liver gluconeogenesis, which uses mainly lactate molecules and amino acids as substrate. Consequently, the activity level of aminotransferases that

participate in protein catabolism also increases, resulting in an increase in the production of nitrogenous compounds—such as urea—derived from this catabolic process (14,15). However, one cannot claim that the increase of ALT serum activity is specifically due to the increased protein catabolism, since amongst the nitrogenous compounds analyzed only serum uric acid was found significantly increased when compared with values at rest ( $p < 0.01$ ). Serum concentration of the remaining nitrogenous compounds (total proteins and serum urea) was not significantly altered.

Urinary urea excretion showed a statistically significant ( $p < 0,05$ ) decrease after training. It should be taken into account that during physical exercise there is a decrease in renal blood flow, and that the glomerular filtration rate and urinary excretion may decrease. Significant urea losses may occur through sweating, particularly during prolonged exercises and in humid and hot environments, which may explain the results obtained (3,5,16).

Conversion of hypoxanthine into xanthine/uric acid is catalyzed by xanthine oxidase and is associated with the formation of superoxide anion, derived from the semi-ubiquinone from the electron transport chain. Statistical analysis of the data showed a significant ( $p < 0,05$ ) increase in serum concentration of uric acid after exercise (1,6,9). This result agrees with a study conducted by Chevion and col (2003), indicating a potential to neutralize peroxy radicals in the aqueous phase and to contribute to the plasmatic antioxidant defense.

Blood count analysis showed a statistically significant ( $p < 0,05$ ) increase in neutrophils relative (cels/%) and absolute (cells/ $\mu$ L) count associated with an equally significant decrease in lymphocytes and eosinophils relative count, and in monocytes and eosinophils absolute (cells/ $\mu$ L) count. This neutrophils increase after exercise possibly occurs because these cells form the front line of the body's defenses against

physical stress and potential trauma due to exercise, triggering a physiological response based on the acute-phase protein secretion, mediators of inflammatory response and hormones such as catecholamines, cortisol, growth hormone (GH), opioid peptides (endorphins), and elements such as interferons, interleukins, tumor necrosis factors and other cytokines (8,12, 16).

There was an alteration in cell rate (cells/%) not reflected in the absolute count, because while one cell strain increased separately, the remaining strains decreased proportionally (cells/ $\mu$ L). Thus, a major parameter to be considered when comparing the absolute and relative analyses is neutrophilia with a left shift, as observed in the athletes of the present study.

Futsal teams rarely exceed 15 athletes, amongst players and substitutes. Therefore, the present study is limited due to its sample size. However, the homogeneity of the team allows that results obtained herein be used as parameters in future studies under the same environmental conditions and the same training protocol.

There is no agreement in literature as to reference values and cut values for detecting physiological and pathological alterations induced by sports in general. This is due to environmental influences such as temperature, humidity, type and intensity of training. The results of the present study will be used as baseline values of each athlete, allowing a systematic monitoring of the participants with regard to hidden lesions, anemia, and identifying signs of overtraining or physical wear as a means of preventing loss of athletic performance during the season.

## **CONCLUSION**

Results obtained herein allow us to conclude that the proposed training protocol induced a lipolysis due to limited supply of carbohydrates that did not show laboratorial signs of proteolysis.

Enzymatic markers together with blood count alterations suggest muscle wear mimicking inflammatory processes. With this study, these inflammatory processes will be able to be minimized by ice baths on the exercised muscles.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to the management, the coaching team, and especially to the Futsal team of the Atlantico/URI who volunteered for this study.

## REFERENCES

1. Altimari IR, Dias RMR, Goulart IF, Avelar A, Altimari JM, Moraes AC. Comparison of the effects of four weeks of strength and Specific circuit training on performance in intermittent run and strength of young soccer players. *Braz J Biomot.* 2008; 2(6): 132-142
2. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47-95.
3. Hellsten WY, Balson PD, Norman B, Sjodin B. The effect of high-intensity training on purine metabolism in man. *Acta Phys Scan.* 1993;149:405-412.
4. Herzberg GR. Aerobic exercise, lipoproteins, and cardiovascular disease: benefits and possible risks. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2004; 29 (6): 800–807.
5. Williams BD, Wolfe RR, Bracy DP, Wasserman DH. Gut proteolysis contributes essential amino acids during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1996; 270: E85-E90.
6. Carroll MF, Temte JL. Proteinuria in adults: a diagnostic approach. *Am Fam Physician.* 2000; 62 (6): 1333-1340;
7. Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci.* 1991; 80:611-618.
8. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiol. Rev.* 2000; 80: 1055-1081.
9. Brites F, Verona J, De Geitere C, Fruchart J, Castro G, Wikinski R. Enhanced cholesterol efflux promotion in well-trained soccer players. *Metabolism.* 2004; 53(10): 1262-1267.

10. Maughan RJ, Donnelly AE, Gleeson M, Whiting PH, Walker KA And Clough PJ. Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Musc Nerve*. 1989; 12(4): 332-6.

11. Siegel AJ, Lewandrowski KB, Strauss HW, Fischman AJ And Yasuda T. Normal post-race antimyosin myocardial scintigraphy in asymptomatic marathon runners with elevated serum creatine kinase MB isoenzyme and Troponin T levels. Evidence against silent myocardial cell necrosis. *Cardiology* 1995; 86(6): 451-6.

12. Kratz A, Lewandrowski KB, Siegel AJ, Chun KY, Flood JG, Cott EV. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. *Am J Clin Pathol*. 2002; 118(6):856-63.

13. Febbraio MK, Dancy J. Skeletal muscle energy metabolism during prolonged, fatiguing exercise. *Jour Appl Phys*. 1999; 87(6): 2341-2347.

14. Brahm H, Piehl-Aulin K, Mallmin H, And Ljunghall S. Bone metabolism in endurance trained athletes: a comparison to population-based controls based on DXA, SXA, quantitative ultrasound, and biochemical markers. *Calcif Tissue Int*. 1997; 61(6): 448-54.

15. Woitge HW, Friedmann B, Suttner S, Farahmand I, Muller M, Schmidt-Gayk H, Baertsch P, Ziegler R, Seibel MJ. Changes in bone turnover induced by aerobic and anaerobic exercise in young males. *J Bone Miner Res*. 1998; 13 (12): 1797-804.

16. Clarkson PM, Tremblay I. Exercise induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. *J Appl Physiol*. 1988; 65:1.

17. Smith LL, Miles M. Exercise induced muscle injury and inflammation. *Exercise and sport science*. Lippincott, Williams and Wilkins. 2000; 401-409.

18. Kanter MM, Lesmes GR, Kaminsky LA, Ham-Saeger LAJ, Nequin ND. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1988; 57(1): 60-3

19. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berensshtein E, Stadtman ER. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sc.* 2003; 100:5119-5123.



**TABLE 1** – Analysis of the effects of acute training on biochemical and blood parameters of athletes at rest and 15 minutes after training. Results are expressed as Mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  in relation to athletes at rest by analysis of parametric data by Student's t test for matched samples.

	Rest	After exercise	P
Lymphocyte relative count (cells/%)	49.3 $\pm$ 2	35.1 $\pm$ 2	<0.001*
Eosinophil relative count (cells/%)	4.0 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.4	0.001*
Segmented neutrophil relative count (cells/%)	43.3 $\pm$ 2.8	60.1 $\pm$ 2,7	<0.001*
Segmented neutrophil absolute count (cells/ $\mu$ L)	2604.5 $\pm$ 224	3556.0 $\pm$ 291	0.008*
Monocyte absolute count (cells/ $\mu$ L)	312.2 $\pm$ 17	211.6 $\pm$ 18	<0.001*
Eosinophil absolute count (cells/ $\mu$ L)	263 $\pm$ 4	117 $\pm$ 3	<0.001*
Magnesium (mg/dL)	1.9 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	0.001*
Glucose (mg/dL)	92.7 $\pm$ 4.8	65.3 $\pm$ 3.4	<0.001*
Uric acid	4.6 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.6	0.01*
Cholesterol (mg/dL)	179.4 $\pm$ 9.4	197 $\pm$ 10	0.01*
HDL Cholesterol (mg/dL)	46.1 $\pm$ 3	57.2 $\pm$ 5	0.003*
Alanine aminotransferase (UI/L)	12.5 $\pm$ 0.8	19.3 $\pm$ 1.3	<0.001*
Lactate dehydrogenase (UI/L)	126.9 $\pm$ 15	214 $\pm$ 15	0.002*
MM creatine kinase (UI/L)	251.8 $\pm$ 19	312 $\pm$ 26	0.04*
Urinary urea (mg/mg creatinine)	40.7 $\pm$ 4.2	36.3 $\pm$ 3.6	0.03*

**TABLE 2** - Analysis of the effects of acute training on physical and chemical urine parameters of athletes at rest and 15 minutes after training. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  in relation to athletes at rest, by the Wilcoxon-Mann-Whitney test for non-parametric data.

<b>PARAMETER</b>	<b>REST</b>	<b>AFTER EXERCISE</b>	<b>P</b>
Hyaline Cast min. count	0.0 $\pm$ 0.0	2.9 $\pm$ 3.9	0.02*
Hyaline Cast max. count	0.0 $\pm$ 0.0	5.8 $\pm$ 2.0	0.007*
Ketones	0.1 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 1.0	0.01*
Mucous	0.7 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.8	0.01*

Capítulo III:

**Acute supplementation of chocolate and/or sports drinks on biochemical parameters of soccer players**

Periódico: Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Status: Submetido

**EFFECTS OF ACUTE SUPPLEMENTATION OF CHOCOLATE AND/OR SPORTS  
DRINKS ON HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF  
PROFESSIONAL SOCCER PLAYERS**

Luciano de O. Siqueira<sup>1</sup>, Jaíse Bortoluzzi<sup>2</sup>, Suellen Savi<sup>2</sup>, Ana Paula  
Deliberal<sup>2</sup>, Fabio Zanin<sup>2</sup>, Patrícia Castelli Canal<sup>2</sup>, José Cláudio Fonseca Moreira<sup>3</sup>.

BP, MSc, Universidade de Passo Fundo, Instituto de Ciências Biológicas,  
Curso de Farmácia, Passo Fundo, RS, Brasil<sup>1</sup>

BP, Universidade de Passo Fundo, Instituto de Ciências Biológicas, Curso de  
Farmácia, Passo Fundo, RS, Brasil<sup>2</sup>

DSc, PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências  
Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brasil<sup>3</sup>

Corresponding author: Luciano de Oliveira Siqueira

Universidade de Passo Fundo - Curso de Farmácia

BR 285, Km 171 Campus I – Bairro São José

99010-210 Passo Fundo-RS

E-mail: luciano@upf.br

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to the management, the coaching team, and especially to the  
soccer team of the Sport Club Passo Fundo who volunteered for this study.

## RESUMO

As alterações bioquímicas induzidas pelo exercício são variáveis e dependem da intensidade, clima, duração e o tipo de esforço. Relatos na literatura sugerem que distúrbios hidroeletrólíticos como indutores de morte súbita. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação aguda de chocolate e bebida isotônica esportiva sobre o metabolismo de atletas profissionais no campo durante sessões de treinamento em temperatura elevada. **Participantes:** Participaram 24 jogadores profissionais de futebol submetidos aos efeitos da suplementação aguda de chocolate e / ou bebida isotônica esportes durante as sessões de treinamento. **Intervenções:** Foram coletadas amostras de sangue em repouso e 15 minutos após o término da sessão de treino para a análise bioquímica das enzimas, lipídios, eletrólitos e hemograma com plaquetas. **Resultados:** Resultado dos efeitos agudos do exercício apresentou um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) na concentração de ácido úrico sérico, glicose, triglicérides e neutrófilos (células /% e células/ $\mu$ l) e uma diminuição significativa na concentração plasmática de magnésio, sódio, potássio, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e contagem relativa de linfócitos (células /%). A análise dos efeitos da suplementação apenas atenuou a diferença induzida por exercícios na concentração de sódio e de colesterol HDL. **Conclusões:** Os resultados sugerem que a suplementação proposta não foi eficaz na prevenção de distúrbios eletrolíticos durante treinamento.

Palavras-chave: Esportes bebida, futebol, chocolate

## ABSTRACT

The biochemical changes induced by exercise are variable and depend on the intensity, climate, duration and type of effort. Reports in the literature suggest the electrolyte disturbances as a cause of sudden death. **Objective:** The purpose of this study was to evaluate the effects of acute supplementation of chocolate and isotonic sports drinks on the metabolism of professional athletes during field sessions of continuous exercise in hot weather. **Participants:** The study was run with 24 professional soccer players submitted to the effects of acute supplementation of chocolate and/or isotonic sports drinks during sessions of continuous exercise in hot weather. **Interventions:** Blood samples were collected at rest and 15 minutes after the end of the training session for biochemical analysis of enzymes, lipids, electrolytes, and blood cell count. **Results:** Results of the acute effects of exercise showed a statistically significant increase ( $p < 0.01$ ) in serum concentration of serum uric acid, glucose, triglycerides and neutrophils (cells/% and cells/ $\mu$ l), and a significant decrease in plasma concentration of magnesium, sodium, potassium, very low-density lipoprotein (VLDL) and percentage of lymphocyte count (cells/%). The analysis of the effects of supplementation only attenuated the difference induced by exercises in the concentration of sodium and HDL cholesterol. **Conclusions:** The results suggested that supplementation suggested is not efficient in preventing electrolyte disorders during training exercises.

Keywords: Sports drink, soccer, chocolate

## INTRODUCTION

During predominantly aerobic exercise, sweat and evaporation the most important mechanisms of the human body lead to an efficient loss of heat by continuously transferring heat to the environment as water evaporates on the skin (1-3).

Sweating is a physiological response that strives to limit the increase in body temperature through the secretion of water to evaporate on the skin, but this loss of fluid is not always offset by the intake of liquids and regulation of temperature during exercise (2-5). This inadequate intake during sports practice is often related to the impossibility of restoring the kind of competition arising from or even to reflect the variable that leads to an inappropriate rehydration (3 -6).

When temperature reaches 30 °C and 35 °C or more, relative humidity is higher than 80% and weight loss is greater than 2%, there may be varying degrees of dehydration, which can cause loss of performance, fatigue, mental confusion, fainting and even sudden death (3,6).

Soccer is a sport with varying degrees of energy requirements, with moments of rest and acute aerobic and/or anaerobic efforts. During a soccer game, a professional athlete can go from a speed of 8 to 13 km in 90 minutes, depending on his position (1). In this period, the athletes are at risk of water losses due to non-renal hypohydration, or even by an inadequate water replacement (1-9).

Chocolate has been the focus of several studies due to its antioxidant and hypocholesterolemic properties related to its high flavonoid content (epicatechin, catechin and procyanidins) (7,8,10-13).

Experimental studies showed that regular supplementation of 100 g of chocolate a day, which corresponds to 11% of an estimated 4000 kcal/day of an

athlete's diet, has an anti-atherogenic potential (11,12, 19) and is likely to induce a significant decrease in lipoperoxidation (TBARS), uric acid, lactate dehydrogenase (LDH) antioxidant status (TRAP), diastolic pressure, total cholesterol levels (LDL fraction).

In addition to flavonoids, chocolate is also rich in electrolytes such as calcium and magnesium, justifying its use in preventing electrolytic disorders induced by sport. However, studies usually show its benefits only when used chronically, since its properties have been little observed acute due to slow gastric emptying and high lipid levels (11-19), which could jeopardize the athletic performance during sports practice.

The purpose of this study was to evaluate the effects of acute supplementation of chocolate and isotonic sports drinks on the metabolism of professional athletes during field sessions of continuous exercise in hot weather.



## MATERIAL AND METHODS

### Subjects:

Twenty-four male professional soccer players competing during the first month of the first series of the regional soccer league participated in the study. The athletes ( $23 \pm 3$  years of age,  $180 \pm 5$  cm tall,  $78 \pm 6$  kg, BMI of  $24.1 \pm 1.5$  kg/m<sup>2</sup>) trained regularly for more than a year, 30 days after the beginning of the season. None of the athletes smoked or had a history of chronic/degenerative illness to justify the use of medication at the time of analysis.

The athletes were randomly divided into four groups of six players. Each group consisted of one goalkeeper, one defender, one side/wing, two midfields and one striker. The groups received following supplementation:

- Control group (G1): water ad libitum.
- Group supplemented with chocolate (G2): pre-supplementation with 100g chocolate milk 30 minutes before training and replacement with water ad libitum.
- Group supplemented with isotonic drink (G3): replacement with 600 ml of commercial isotonic sports drink (consisting of 42 mg/dl chloride, 12 mg/dl of potassium, 45 mg/dl sodium and 6g/dl glucose, approved for marketing by the FDA) during training.
- Group supplemented with chocolate and isotonic drinks (G4): pre-supplementation with 100g chocolate milk 30 minutes before training and replacement with 600 ml of commercial isotonic sports drink (consisting of 42 mg/dl chloride, 12 mg/dl of potassium, 45 mg/dl sodium and 6g/dl glucose, approved for marketing by the FDA) during training.

## **Ethical Aspects**

The study protocol was previously submitted to and approved by the Research Ethics Committee of the University of Passo Fundo, according to the Brazilian National Health Council's regulation 196/1996. All athletes agreed to participate voluntarily in the study, after having been informed of its purposes and potential risks. An informed written consent according to the Nuremberg Code (1947), the Declaration of Human Rights (1948), and the Declaration of Helsinki was then signed.

### **Environmental conditions:**

The training occurred at 9:30 a.m. in a soccer stadium with approximate duration of 90 minutes, at an altitude of 687m above sea level. The tests were performed at an initial temperature of 28 °C and 60% relative humidity and ended at 31 °C and 65% relative humidity. The players used light clothes during the training.

### **Training protocol:**

The training protocol included physical activity, subdivided into three phases:

- Warm up: 10 minutes of light jog on clay track.
- Training in sand box:

Six series of jumps out of five cones returning to sprint 10 meters with 1-minute recovery between each series.

Six sets of three 10-m sprints and back per repetition, with 1-minute recovery period between each series.

- Recovery: 20 minutes of light running on grass field.

## **Analytical protocol**

### **- Blood samples**

Blood samples were aseptically collected from the antecubital fossa of athletes at rest and 15 minutes after the end of the training session. A 2-mL blood sample was stored in flasks containing 2 mg/mL ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) for blood analysis. A complete blood count with platelets was performed by electronic impedance cell counter ABX Micros 60<sup>®</sup> (ABX Diagnostics, Montpellier, France). A differential leukocyte count was performed by microscopic analysis of 200 cells (Nikon Eclipse 600<sup>®</sup>, Nikon Corporate Instruments, Japan) in blood slides stained by Romanowsky technique (Merck<sup>®</sup>). The differential analysis of cell strains was expressed in relative (cells/%) and absolute (cells/ $\mu$ L) counts.

To obtain serum, the balance (8 mL) of the sample collected was stored in a test tube without anticoagulant. Next, it was centrifuged at 1500 rpm for 15 minutes. Serum was then extracted and placed into test tubes pre-treated with 30% nitric acid for 24 hours, and rinsed five times with bidistilled water for spectrophotometrically measuring biochemical parameters such as calcium, phosphorus, magnesium, glucose, uric acid, creatinine, urea, total proteins, aminotransferases (ALT/AST) alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase (LDH), total creatine kinase, MB creatine kinase, triglycerides, total cholesterol and fractions by fully enzymatic methods from Labtest<sup>®</sup> Diagnostica S.A.(Belo Horizonte, Brazil) on a semi-automated equipment from Labquest<sup>®</sup> (Labtest<sup>®</sup> Diagnostica S.A., Belo Horizonte, Brazil). Sodium, potassium, and chlorides were measured by ion-selective electrodes on a Medica EasyLyte<sup>®</sup> (Medica Corporate Profile, Bedford, Massachusetts USA) analyzer.

#### - Urine samples

A midstream urine sample, with previous washing of the genitals, of approximately 20-50 mL was collected in universal collecting flasks, from athletes at rest and up to 15 minutes after the training session. The samples were placed in standard flasks, which were then transferred from the collecting site to the laboratories of the College of Pharmacy of the University of Passo Fundo, under controlled temperature. The samples were immediately processed for microscopic and physical-chemical analysis of the sediment. They were centrifuged at 1800 rpm for 10 minutes, and 1 mL of the supernatant was harvested for later biochemical analysis of total urinary proteins, uric acid, creatinine and urea (Labtest<sup>®</sup> Diagnostica S.A.).

The physical-chemical analysis was performed by visual observation of urine appearance and color, and the density was measured by handheld refractometer (LF<sup>®</sup> Equipmentos Hospitalares, Sao Paulo, Brazil).

The chemical analysis was performed with polyelectrolyte test strips (ComburTest Dade-Behring<sup>®</sup>) in order to determine proteins, glucose, nitrite, bilirubin, pH, ketone bodies, leucocytes, blood and urobilinogen in the non-centrifuged urine sample.

The microscopic analysis analyzed urinary sediment for epithelial cells, crystals, leucocytes, erythrocytes, bacteria, mucous filaments and cylinders.

#### **Statistical analysis**

Statistical analysis was divided into two parts: the analysis of the acute effects of exercise in relation to the experimental protocol (rest/post-exercise) and an

analysis of the experimental groups taking into account the supplements protocol (chocolate/isotonic drinks).

Data were evaluated for normality by Kolmogorof-Smirnov test. For the analysis of acute effects of exercise on the body in comparison with rest (regardless of the supplementation protocol), results were divided into two groups (rest and after training), then analyzed by comparing the averages by Student's t test for paired samples. For the analysis of non-parametric data, we used the Wilcoxon-Mann-Whitney test. Minimum level of significance was  $p < 0,05$ .

The impact of different supplementation protocols between training, the difference in the average number of experimental groups (G1, G2, G3 and G4), were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), and followed by a post-hoc analysis by Tukey's test, also Kruskal - Wallis test for non-parametric data, with a minimum level of  $p < 0,05$ . Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

## RESULTS

The sample comprised exclusively male athletes,  $23 \pm 3$  years of age in average,  $180 \pm 5$  cm high, weighing  $78 \pm 6$  kg, BMI of  $24.1 \pm 1.5$  kg/m<sup>2</sup>. All athletes were in optimal physical conditions and were not taking any drugs or supplements that might interfere in the proposed analyses. The participants did not perform any extenuating physical activity in the 72 hours preceding the training.

The results of the acute effects of exercise on the biochemical parameters analyzed regardless of the supplementation protocol showed a statistically significant increase ( $p < 0.01$ ) in serum concentration of serum uric acid, glucose, triglycerides and neutrophils (cells/% and cells/ $\mu$ l). Urine showed an increase in color intensity, as well as increased presence of mucus, casts and protein ( $p < 0,05$ ).

Moreover, the training led to a statistically significant decrease in plasma concentration of magnesium, sodium, potassium, very low-density lipoprotein (VLDL) and percentage of lymphocyte count (cells/%). Other laboratory parameters examined showed no significant difference (data not shown).

The analyses of the effect of supplementation with chocolate and/or sports drink described in Table 3 only showed differences in sodium and HDL concentration. The results show a sharp decline in serum sodium concentration in the group supplemented with chocolate (loss of 19 mEq/L in average) when compared with the group supplemented with isotonic drinks and chocolate (loss of 6 mEq/L in average). These findings suggest a greater need of intestinal sodium ions for a higher absorption of glucose present in chocolate; this was corrected when the athletes were concomitantly supplemented with isotonic drinks.

HDL cholesterol showed no significant difference in the control group (water). However, it showed a significant increase in the groups supplemented with chocolate

(G2) and isotonic drinks (G3). On the other hand, it presented a decrease in the group supplemented simultaneously with chocolate and isotonic drinks (G4).

## **DISCUSSION**

The importance of developing strategies for water and electrolyte reposition in high-performance athletes is clear. Since there is considerable variability in sweating rates and sweat electrolyte content between individuals, customized fluid replacement programs are recommended (18).

The statistical analysis of results shows that the training protocol used, regardless of the type of supplements, showed a significant increase in serum concentration of uric acid, glucose, triglycerides and neutrophils (cells/% and cells/ $\mu$ l), and a significant decrease in plasma concentration of magnesium, sodium, potassium and percentage of lymphocyte count (cells/%). These findings agree with those of other researchers who observed that dehydration and excessive changes in electrolyte balance could compromise performance (16-19).

Kirkendall *et al* (1993) showed that drinking a carbohydrate solution during a match may not only help to delay the onset of severe dehydration, it also may improve work rate. Moreover, The American College of Sports Medicine (1996) recommendations for fluid replacement during distance running recognize this inter-individual variation in requirements and set wide limits, i.e. between 100–200 ml every 10–20 min. Based on these principles, the supplemental intake 600 ml of sports drink appears to be ineffective in correcting electrolytic changes found in the present study.

The analysis of supplementation with chocolate shows an increase in HDL concentration in the group treated only with chocolate, and a decrease in HDL concentration in the group treated with chocolate and sports drink, when compared with the control group. These findings disagree with Fraga *et al* (2005) and Arai *et al* (2000). Fraga *et al* (2005) showed that the consumption of 100 g chocolate for 14 days was significantly associated with a decrease in diastolic blood pressure (25 mmHg), mean blood pressure (25 mmHg), plasma cholesterol (211%), LDL cholesterol (215%), malondialdehyde (212%), urate (211%), and lactate dehydrogenase (LDH) activity (211%), and an increase in vitamin E (12%).

The determination of HDL cholesterol by means of precipitation followed by reaction with cholesterol oxidase is susceptible to a large variability inherent to the analytical process to and the determination of LDL cholesterol by the equation of Friedwald, which could limit the disparity in results presented herein for this parameter (Sposito *et al*, 2007). The analytical determination using the direct determination of HDL and LDL cholesterol, and apolipoprotein A and B could ensure greater consistency of results.

On the other hand, the addition of sodium to the sports drink and sugar to the chocolate promoted a greater control of sodium levels in the group treated with both supplements. The results also show a significant decrease in sodium concentration in the group supplemented only with chocolate, probably due to the increased need for sodium in the intestinal absorption of sugar intake. The combination of supplementation with chocolate and sports drink appears to have controlled this decrease in the group treated with both supplements. This is mainly due to the increased supply of sodium in the sports drinks, significantly contributing to the control of serum sodium in this group.



During exercise, the human thirst mechanism may be insufficient. Despite exercise-induced increases in extracellular osmotic pressure, blood osmolality, and angiotensin II, enhanced thirst may not sufficiently promote fluid intake to maintain water balance, a phenomenon known as "voluntary dehydration". The supplementation with 600 ml of sports drink was adopted according: Position stand: exercise and fluid replacement of the American College of Sports Medicine". Thus, the results presented here show that the proposed supplementation may have been insufficient due to individual variables resulting from different degrees of water loss (18)

There is no consensus in the literature about biochemical disorders induced by physical exercise, since they are dependent on variables such as body temperature, ambient temperature, relative humidity, altitude, physical condition, age, sex, intensity of training, among others. It is very difficult to reproduce studies conducted under specific situations as reported in the literature. Thus, the results obtained in this study should be analyzed in the light of the proposed conditions, so that the analysis of problem situations available in the literature should be adopted as basic knowledge on the effects of supplementation with sports drinks and chocolate.

## **CONCLUSION**

The present results show that the training protocol under the proposed conditions led to a variable degree of electrolyte disorder characterized by an increase ( $p < 0.01$ ) in serum concentration of uric acid, glucose, triglycerides and neutrophils (cells/% cells and/ $\mu\text{l}$ ), and to a significant decrease in plasma concentration of magnesium, sodium, potassium, very low-density lipoprotein (VLDL) and percentage of lymphocyte count (cells/%). Supplementation on the proposed terms did not fix the acute distress caused by training, except for better control of sodium concentration in the group supplemented with both sports drink and chocolate

## REFERENCES

1. Maughan RJ, Merson SJ, Broad NP, *et al.* Fluid and Electrolyte Intake and Loss in Elite Soccer Players During Training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2004; 14: 327-340
2. Ali A, Williams C, Nicholas CW, Foskett A. The Influence of Carbohydrate-Electrolyte Ingestion on Soccer Skill Performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39:1969-1976
3. Shirreffs SM, Aragon-Vargus LF, Chamorro M, Maughan RJ, Serratoso L, Zachwieja JJ. Sweating response of elite professional soccer players. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35(5): Supplement abstract 140
4. Bergeron MF. Nutrition and performance: do we still need to stress hydration? *Curr Sports Med Rep.* 2003; 2:181-182.
5. Burke LM, Hawley JA. Fluid balance in team sports: guidelines for optimal intake. *Sports Med.* 1997; 24:38-54.
6. Maresh CM, Gabaree-Boulant CL, Armstrong LE, Judelson DA, Hoffman JR, Castellani JW, Kenefick RW, Bergeron MF and Casa DJ. Effect of hydration status on thirst, drinking, and related hormonal responses during low-intensity exercise in the heat. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 39-44

7. Fraga CG, Actis-Goretti L, Ottaviani JI, Carrasquedo F, Lotito SB, Lazarus S, Schmitz HH, Keen CL. Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clin Dev Immunol.* 2005; 12(1): 11–17.
8. Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13:41–49.
9. Lazarus SA, Adamson GE, Hammerstone JF, Schmitz HH. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:3693–3701.
10. Arts IC, Hollman PC, Kromhout D. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet.* 1999; 7: 354:488
11. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr.* 2000; 130:2109-2114.
12. Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.* 2001;74: 596-602.

13. Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinase N. Dietary intakes of flavonols flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr.* 2000; 130:2243–2250.
14. Mathur S, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr.* 2002; 132:3663–3667.
15. Leiper JB, Prentice AS, Wrightson C, Maughan RJ. Gastric emptying of a carbohydrate electrolyte drink during a soccer match. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33(11) 1932-1938.
16. Michael N, Burke L.M, Eichner R, Maughan R, Montain SJ, Stachenfeld NS. Exercise and Fluid Replacement. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39(2):377-390.
17. Kirkendall DT. Effects of nutrition on performance in soccer. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1993; 25:1370-1374.
18. American College of Sports Medicine. Position stand: exercise and fluid replacement. *Med Sci Sports Exerc.* 1996; 28:i-vii.
19. Fraga C. G, Actis-Goretta L, Ottaviani J.I, Carrasquedo F, Lotito S.B, Lazarus S, Schmitz H.H, Keen C.L.. Regular Consumption of a Flavanol-rich

Chocolate can Improve Oxidant Stress in Young Soccer Players. *Clin Dev Immunol.* 2005; 12 (1): 11-17.

20. Sposito AC. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.* 2007; 88 suppl.1: 2-19 .

## TABLES

**TABLE 1:** Analysis of the effects of acute training on biochemical and blood parameters of athletes at rest and 15 minutes after training, disregarding the protocols of electrolyte and carbohydrate replacement. Results are expressed as  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  in relation to athletes at rest by analysis of parametric data by Student's t test for matched samples.

	Rest	After exercise	p
Lymphocyte relative count (cells/%)	38.9 $\pm$ 2.2	33.0 $\pm$ 1.6	0.034*
Segmented neutrophil relative count (cells/%)	47.5 $\pm$ 2.1	56.3 $\pm$ 2.0	0.002*
Segmented neutrophil absolute count (cells/ $\mu$ L)	2772.5 $\pm$ 205.6	3969.3 $\pm$ 232.6	<0.001*
Neutrophil in bands absolute count (cells/ $\mu$ L)	171.7 $\pm$ 18.6	258.7 $\pm$ 34.6	0.011*
Magnesium (mg/dl)	2.2 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.0	<0.001*
Sodium (mEq/l)	146.8 $\pm$ 3.0	136.5 $\pm$ 1.4	0.004*
Uric acid (mg/dl)	4.3 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.2	<0.001*
Potassium (mEq/L)	4.5 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.1	<0.001*
Phosphorus (mEq/L)	3.7 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2	0.004*
Glucose (mg/dl)	82.2 $\pm$ 2.5	100.9 $\pm$ 2.9	<0.001*
Triglycerides (mg/dl)	81.5 $\pm$ 5.9	106.9 $\pm$ 10.0	<0.001*
Cholesterol VLDL (mg/dl)	16.3 $\pm$ 1.2	21.2 $\pm$ 0.3	<0.000*

**TABLE 2** - Analysis of the effects of acute training on chemical urine parameters of athletes at rest and 15 minutes after training, disregarding the protocols of electrolyte and carbohydrate replacement. Results are expressed as  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  in relation to athletes at rest, by the Wilcoxon-Mann-Whitney test for non-parametric data.

<b>PARAMETER</b>	<b>Rest</b>	<b>After exercise</b>	<b>P</b>
Hyaline cast max. count	$0.09 \pm 0.06$	$2.4 \pm 0.6$	0.003*
Color	$1.2 \pm 0.09$	$1.7 \pm 0.1$	0.007*
Mucus	$0.9 \pm 0.2$	$1.7 \pm 0.1$	0.003*
Protein	$0.09 \pm 0.09$	$0.5 \pm 0.1$	0.046*



**TABLE 3:** Analysis of the effects of supplementation of athletes at rest and 15 minutes after training, considering the protocols of electrolyte and carbohydrate replacement. Results are expressed as  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  in relation to athletes at rest, by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for parametric data.

	Rest			After exercise			Difference			
	(A)			(B)			(B-A)			
	Average	F	P	Average	F	P	Average	F	P	
sodium (mEq/l)	Water	146.8 $\pm$ 3.0		136.5 $\pm$ 1.4			-10.35 $\pm$ 1.63			
	Chocolate	154.7 $\pm$ 6.7		135.3 $\pm$ 1.5			-19.37 $\pm$ 5.18			
	Sports drink	145.9 $\pm$ 6.1	1.165	0.353	134.8 $\pm$ 2.0	1.449	0.412	-11.12 $\pm$ 4.05	3.790	0.031*
	Chocolate and sports drink	140.0 $\pm$ 3.3			133.5 $\pm$ 1.1			-6.45 $\pm$ 2.17		
Cholesterol HDL (mg/dl)	Water	68.5 $\pm$ 2.6		68.0 $\pm$ 3.2			-0.50 $\pm$ 0.64			
	Chocolate	55.0 $\pm$ 6.3		62.0 $\pm$ 5.5			7.00 $\pm$ 0.82			
	Sports drink	54.8 $\pm$ 3.7	1.225	0.332	56.2 $\pm$ 4.8	1.772	0.192	1.33 $\pm$ 1.13	3.892	0.028*
	Chocolate and sports drink	61.2 $\pm$ 6.9			52.3 $\pm$ 5.3			-8.83 $\pm$ 1.65		

Capítulo IV:

**Analyses of biochemical parameters and markers of oxidative markers in  
blood of indoor soccer athletes during a season**

Periódico: Journal of Science and Medicine in Sport

Status: Submetido

**Analyses of biochemist parameters and markers of oxidative status in blood of indoor soccer athletes during season**

Luciano de O. Siqueira<sup>1</sup>, Joseane Sampaio, Daila Beniek, Leila Fontana, José Cláudio F. Moreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Curso de Farmácia, Erechim, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Luciano de Oliveira Siqueira  
Universidade Regional Integrada – Campus Erechim  
Centro de Ciências da Saúde  
Curso de Farmácia e Bioquímica  
Av. 7 de Setembro 1921 – Erechim – RS  
E-mail: lsiqueirabr@yahoo.com.br

**Analyses of blood biochemical parameters and oxidative status of futsal athletes during the season.**

**ABSTRACT**

The aim of present study was to evaluate the oxidative stress of professional futsal athletes during a season. Twelve male athletes competing during the first month of the Golden Series of the Brazilian League of Indoor Soccer participated in the study. Three blood samples were aseptically collected from the antecubital vein of athletes at rest, 15 minutes and 5 hours after the end of each training session (March, August, and November 2007). Markers of oxidative status were quantified in plasma. The results show an increase in plasma proteins, total vitamin C, total phenolic compounds, TBARS, total SH, and protein carbonyl during the season ( $p < 0.01$ ). Furthermore, the results show a significant decrease ( $p < 0.01$ ) in uric acid, oxidized vitamin C, non-protein SH levels in the blood, associated with a decrease in the activities of LDH and CK total. Strategies for prevention, diagnosis, and therapy need to be systematically introduced to avoid the impact of oxidative stress in professional athletes.

Keywords: ROS, oxidative stress, free radicals, sports

## INTRODUCTION

Moderate and regular physical exercise has been widely studied by the scientific community due to proven health benefits, among other by reducing the risk of cardiovascular diseases, certain cancers, osteoporosis, and obesity (1-3). Moreover, strenuous physical exercise and high-yield sports are involved in an increase in oxidative stress, lipid peroxidation, protein glycation, and muscle damage (2-3) This damage may cause a decrease in ATP production and muscle strength, whose implications may contribute to increases in muscle pain after exercise and, therefore, athletic performance (2-3).

Oxidative stress is defined as a condition in which the cellular pro-oxidants exceed the capacity of physiological neutralization. The scavenging of reactive oxygen and nitrogen species is made by the endogenous antioxidant defense system in conjunction with exogenous antioxidants consumed through diet. The generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) occurs regularly as part of normal cellular metabolism in a healthy individual, but increases under physical stress conditions. Anaerobic and aerobic exercise of sufficient intensity and duration has been reported to increase the extent of oxidative damage to proteins, nucleic acids, and lipids (3-6).

Strenuous exercise may cause oxidative stress through oxidation of glutathione, release of cytoplasmic enzymes, non-enzymatic glycation of proteins, lipid peroxidation, DNA damage, and other signs of compromised cells (1-7). However, there is evidence that reactive oxygen species (ROS) are not only toxic but also play an important role in cell signaling and regulation of gene expression (6). Xanthine oxidase is involved in the generation of superoxide associated with strenuous exercise. Studies show that allopurinol – an inhibitor of this enzyme –

helps to minimize muscle damage after strenuous exercise, but also modifies cell-signaling pathways associated with moderate and intense exercise (8). Thus, the ROS can act as signposts during exercise, since reducing their production may inhibit the activation of pathways that cause significant adjustments to the useful cells (4,6,8). Because these signals may result in the regulation of key antioxidant enzymes, the exercise itself may be considered as antioxidant. Thus, the interference of antioxidants in the metabolism of free radicals may hinder useful adaptations to training (4-8).

Moderate to intense exercise has been associated with an increased predisposition to sudden death induced by sport, responsible for 460.000 deaths in the United States in 1999, according to the Center for Disease Control and Prevention (CDC). Sudden death is related to an endothelial dysfunction associated with increased oxidative stress. The endothelial damage is regulated in part by the NOS, which may reduce endothelial expression of several inflammatory mediators and adhesion molecules that increase the vulnerability of atherosclerotic plaques, predisposing people or athletes to myocardial infarction (7).

The discussion on the deleterious and beneficial effects of exercise on our metabolism are still conflicting and seem far from being conclusive, since the information on the oxidative damage caused by strenuous exercise is significantly related to the type, intensity, and duration of the effort (4-9).

The analysis of oxidative stress markers in plasma allows a less invasive determination than other tissues (without the need for biopsy) and reflects a systemic response of the body (8,9)

There are few reports of studies related to the chronic effects of futsal training. Therefore, the purpose of this study was to analyze the oxidative modifications of

proteins, lipids, and glutathione in professional futsal athletes after intermittent exercise during a 9-month season.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

Twelve male athletes competing during the first month of the Golden Series of the Brazilian League of Indoor Soccer participated in the study. Athletes were submitted to anamnesis consisting of a standard interview concerning the intake of drugs or supplements, time of training, height, weight, and related information. Athletes were in average  $23.8 \pm 5.1$  years old,  $174 \pm 5$  cm high, weighted  $75.8 \pm 6.2$  kg, and had a BMI of  $25.0 \pm 1.9$  Kg/m<sup>2</sup>. They had been training for more than two years, using athletic shoes provided by the club's sponsoring company. The athletes were evaluated after 72 hour of physical rest and 8 hour of fasting.

### **Ethical Aspects**

None of the athletes was smoking or had a history of chronic/degenerative illness to justify the use of medication at the time of analysis. The study protocol was previously submitted to and approved by the Research Ethics Committee of the University of Passo Fundo, according to the Brazilian National Health Council's regulation 196/1996. All athletes agreed to participate voluntarily in the study, after having been informed of its purposes and potential risks. An informed written consent according to the Nuremberg Code (1947), the Declaration of Human Rights (1948), and the Declaration of Helsinki was then signed.

### **Environmental conditions**

The training session was held in the morning at a sports hall and lasted approximately 90 minutes. Tests were conducted at the beginning (March) and in the



middle of the season (August). The month of September was a recess period of 30 days. The last gathering was held at the end of the season (November). The athletes were always dressed in light training outfit.

### **Training protocol**

The training protocol included approximately 30 minutes of physical activity, subdivided into three phases:

- I. 10 min of soft jog
- II. 10 min of switching between a 10-sec sprint and a 20-sec jog
- III. 10 min of switching between a 30-sec sprint and a 90-sec light jog

After the aerobic training, the athletes performed 30 min of leg developing exercises, three sets of 12 repetitions each, with 45 sec interval for recovering between one machine and the next.

### **Analytical protocol**

Three blood samples were aseptically collected from the antecubital vein of the athletes at rest, and 15 minutes and 5 hours after the end of each training session (March, August and November). A 2-mL blood sample was stored in flasks containing heparin for later blood analysis. For obtaining serum, the balance (8 mL) of the sample collected was stored in a test tube without anticoagulant. Then, the blood was centrifuged at 1500 rpm for 15 minutes; subsequently, the serum was extracted and placed into test tubes pre-treated with 30 % nitric acid for 24 hours, and rinsed five times with bidistilled water for spectrophotometric quantification of biochemical parameters such as glucose, uric acid, creatinine, urea, total proteins, lactate dehydrogenase (LDH), total creatine kinase (CK-total), creatine kinase mb

(CK-mb). They were measured using standard enzymatic methods (Labtest<sup>®</sup> Diagnostica S.A., Belo Horizonte, Brazil) on Labquest<sup>®</sup> semi-automated equipment (Labtest<sup>®</sup> Diagnostica S.A., Belo Horizonte, Brazil).

### **Markers of oxidative status**

Plasma TBARS, a measure of lipid peroxidation, were determined in plasma. 300  $\mu$ L of plasma and 600  $\mu$ L TCA (2:1) were added and centrifuged at 10,000g for 10 min. 500  $\mu$ L of supernatant were reacted with 500  $\mu$ L of TBA (0.67%), boiled for 20 minutes, cooled down after 5 min, and then read at 532 nm. Results are expressed in  $\eta$ M/protein<sup>-1</sup> (11). Protein oxidation was measured as total carbonyl groups content by reacting with 2,4 DNPH as described by Levine *et al* (1990). Erythrocyte catalase was measured by the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm. The reaction was obtained with 50 mmol/L of phosphate buffer pH 7.4 and 0.3 mol/L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results are expressed as U.mg<sup>-1</sup> protein (13). Erythrocyte Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity was assayed by measuring porphobilinogen formation by the method of Sassa (1982). Nitric oxide (NO) production was assessed by measuring the stable NO metabolite nitrite in a microtitre plate adaptation of the Griess assay as previously described by Nicholson *et al* (1993). Total phenolic compound levels were measured in plasma using the modified method of Folin-Ciocalteu. 100  $\mu$ L of plasma were mixed with 300  $\mu$ L of trichloroacetic acid (15%) and centrifuged at 10,000g for 10 min at 4°C. Then, 100  $\mu$ L of the supernatant were added to 1,500  $\mu$ L of distilled water, 100  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent and 200  $\mu$ L of saturated solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The phenolic content was assessed spectrophotometrically at 725 nm. Tannic acid was used as standard. Results are expressed as tannic acid equivalents/mL of plasma (16). Total and non-protein thiol groups were determined by the method of Ellman

(1959). Ascorbic acid status was determined as described by Jacques-Silva *et al* (2001).

### **Chemicals**

Glacial acetic acid, sulfuric acid, perchloric acid, ascorbic acid, mercuric chloride, thiourea, dinitrophenylhydrazine, and Folin-Ciocalteu reagent were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), d-aminolevulinic acid, Griess reagent (modified), p-dimethylaminobenzaldehyde, and DL-dithiothreitol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trichloroacetic acid, CuSO<sub>4</sub>, and NaCl were obtained from Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

### **Statistical analysis**

The data were tested for normality by Kolmogorov-Smirnov test.

Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test when F test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 13.0) software in a PC-compatible computer. A value of  $p < 0,05$  was considered to be significant. The data were analyzed separately in two variables: time of year (March, August, and November) and training phase (rest, 15 minutes, and 5 hours). The data were analyzed together and the variables season of the year *versus* phase of training were compared. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

## RESULTS

The results of glucose, urea and reduced vitamin C showed no significant difference ( $p > 0,05$ ) during the phases of training or during the season (Tables 1 and 4).

Statistical analysis of results shows a statistically significant increase ( $p < 0.01$ ) in plasma proteins (Table 1), TBARS and protein carbonyls (Fig 3), total vitamin C, total phenolic compounds, and total SH (Table 4) during the season. Furthermore, the results also show a significant decrease ( $p < 0.01$ ) in uric acid (Table 1), oxidized vitamin C, and non-protein SH (Table 4) in the plasma, associated with a decrease in the activities of LDH and total CK (Table 2).

During the season, ALA-D, NOS and CAT results were expressed in quadratic curve ( $a > 0$  concave up or  $a < 0$  concave down). Analysis of the results shows an increase in CAT and NOS activities in mid-season, followed by a decrease at the end of the season ( $p < 0.01$ ). Conversely, ALA-D activity showed a significant decrease in mid-season, followed by an increase at the end of the season ( $p < 0.01$ ).

## DISCUSSION

The statistical analysis of the results shows a significant increase ( $p < 0.01$ ) in plasma proteins, total vitamin C, total phenolic compounds, TBARS, total SH and protein carbonyl. These results agree with Nikolaidis *et al* (2007), who found that all markers of muscle injury changed significantly after 3 weeks of training. They observed a decrease in GSH and GSH/GSSG associated with an increase in GSSG, TBARS, protein carbonyl, catalase, uric acid, and bilirubin.

A model proposed/suggested by Bloomer *et al* (2004), comprising 13 males performing a set of 15 weight squats (Barbell squats) at two different occasions, showed that the level of oxidative stress right after (1 minute) effort was not enough to change the response pattern of protein carbonyl, lipid peroxidation and oxidative stress, demonstrating that the analysis immediately after a single squats session in a short period of time induced a limited oxidative status. On the other hand, results obtained in the present study contradict this response pattern, since there was an oxidative response in the short (15 minutes and 5 hours after effort) and in the long time (during the season).

The statistical analysis of the results also shows a statistically significant reduction in uric acid, oxidized vitamin C, and non-protein SH, associated with a decrease in LDH and CK total activities.

The plasma uric acid can neutralize peroxy radicals in the aqueous phase and contribute to plasma antioxidant defense (18-21). During exercise, energy phosphates of purine (ATP) are used and catabolized to ADP, which is degraded to AMP, then to hypoxanthine, which is converted to xanthine, and then to uric acid. The conversion of hypoxanthine to xanthine/uric acid can be catalyzed by xanthine oxidase and is associated with the formation of the superoxide ion, derived from the

semi-ubiquinone in the electron transport chain. Therefore, it can be said that xanthine oxidase is involved in the generation of superoxide ion during strenuous exercise. The results shows a significant decrease in uric acid concentration during the season. This decrease in acid uric may be related to its antioxidant (scavenging) activity or to the renewal of ATP through the aerobic glycolytic pathway, which does not allow ATP catabolism to uric acid. This result is similar to a study by Robertson *et al* (1991), although other studies indicate an increase in serum concentration of uric acid after the completion of intense exercise (20,21,22). These results could indicate that the ROS generated during exercise may act as indicators of increased production of enzymes important for the adaptation of muscle cells during exercise (6,23)

The reduction of the enzyme activity of the muscle damage markers CK and LDH found in this study may be related to a decreased activity of xanthine oxidase and, consequently, a decrease in plasma concentration of uric acid. The use of allopurinol (an inhibitor of this enzyme) may prevent muscle damage caused by strenuous exercise since it modifies the process of cell signaling during moderate and intense exercise in humans and in rats. A clear example that this inhibition may present a protective effect against muscle damage was confirmed in cyclists supplemented with allopurinol during the Tour de France. Athletes supplemented with allopurinol exhibited less exuberant elevations in the activities of creatine kinase, lactate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase compared with those not supplemented (8).

This study is limited by the fact that the analysis of biochemical parameters in the course of a season may experience significant analytical interference due to the use of different types of reagents and calibrators. The use of quality control serum for

some tests as glucose, protein, urea, uric acid, and enzymes helps to minimize analysis interferences. However, the lack of quality control serum for parameters such as TBARS, NOS and others, may significantly affect results. The use of lyophilized serum in the dosages would allow performing biochemical tests in a single analytical session, minimizing the effects from the preparation of reagents, sample storage and equipment calibration.

## **CONCLUSION**

Measuring the acute effects of the training pattern of a futsal team during a season under the proposed conditions was effective in diagnosing various oxidative stress conditions. We also highlight its clinical applicability in improving the team's athletic performance in the course of one year of training. Thus, the serial analysis of acute biochemical effects at rest, 15 minutes after effort and 5 hours later, as proposed in this study, was satisfactory for analyzing and monitoring the athletes during the season. The advantage of this model is the fact that all testing can be done in one day, preventing disorders related to training camp periods and travels during the season.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to the management, the coaching team, and especially to the futsal team of the Atlantic/URI who volunteered for this study.

## REFERENCES

1. Selman C, McLaren LS, Collins AR, Duthie GG, Speakman JR. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 401: 255–261.
2. Baker J, Bailey D, Hullin D, Young I, Davies B. Metabolic implications of resistive force selection for oxidative stress and markers of muscle damage during 30 s of high-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2004; 92: 321–327.
3. Bloomer RJ, Fry AC, Falvo MJ, Moore CA. Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *J Sci Med Sport.* 2007;10:411-417.
4. Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic Exercise and Oxidative Stress: A Review. *Can J Appl Physiol* 2004; 29(3): 245-263.
5. Halliwell B, and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (2007). Clarendon Press, Oxford (fourth edition), UK.
6. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44:126–131
7. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial Function: Cardiac Events. *Circulation.* 2005; 111: 363-368.



8. Gomez-Cabrera MB, Pallardo FV, Sastre J, Vina J; Del-Moral LG. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the tour de france. JAMA. 2003;289(19):2503-2504.
9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39 (1): 44-84.
10. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev. 2002; 82: 47-95.
11. Esterbauer H, Cheeseman KH.; Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 1990; 186:407-421.
12. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, AHN BW, Shaltiel S And Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990; 186: 464-478.
13. Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 1984; 105:121-6.
14. Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme. 1982; 28 (2-3): 133-45.

15. Nicholson AG, Haites NE, McKay NG, Wilson HM, MacLeod AM, Benjamin N. Induction of nitric oxide synthase in human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 193:1269-74.
16. Waterman PG, Mole S. *Analysis of phenolic plant metabolites.* Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1994: 238p.
17. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1969; 82: 70-77.
18. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol.* 2001; 88(3):119-125.
19. Nikolaidis MG, Paschalis V, Giakas G, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D, Jamurtas AZ. Decreased Blood Oxidative Stress after Repeated Muscle-Damaging Exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39 (7): 1080-1089.
20. Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci.* 1991; 80: 611-618.
21. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1329-1341.

22. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berensshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Nat Acad Sci*. 2003; 100: 5119-5123.

23. Hellsten WY, Balson PD, Norman B, Sjodin B. The effect of high-intensity training on purine metabolism in man. *Acta Physiol Scand* .1993; 149: 405-412.

24. Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44 (2): 142-152.

25. Antunes-Neto JMF, Toyama MH, Carneiro EM, Boschero AC, Silva LP, Macedo DV. Circulating leukocyte heat shock protein 70 (HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. *Stress*. 2006; 9(2): 107–115.

26. Knez WL, Jenkins DG, Coombes JS. Oxidative Stress in Half and Full Ironman Triathletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2007; 39 (2): 283-288.

## TABLES

**Table 1** – Analysis of the acute effects of energy metabolism markers in athletes at rest, and 15 minutes and 5 hours after exercise, during a futsal season. Results are expressed as  $\pm$  S.E.M. Means followed by same letters are not statistically different to each other at a significance level of ( $p > 0,05$ ) by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

		<b>rest</b>	<b>15 minutes after training</b>	<b>5 hours after training</b>	<b>p</b>
Glucose (mg/dl)	March	92,9 $\pm$ 5,0	80,5 $\pm$ 2,0	79,4 $\pm$ 3,2	NS
	August	92,8 $\pm$ 7,1	88,4 $\pm$ 2,5	93,8 $\pm$ 2,9	
	November	89,4 $\pm$ 7,1	86,3 $\pm$ 4,8	83,8 $\pm$ 4,0	
Proteins (g/dl)	March	7,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	7,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	p < 0.01
	August	7,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	7,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	
	November	8,3 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	8,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	9,1 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	
Urea (mg/dl)	March	44,2 $\pm$ 3,0	44,0 $\pm$ 3,2	43,3 $\pm$ 1,5	NS
	August	51,6 $\pm$ 4,0	49,3 $\pm$ 2,2	52,4 $\pm$ 2,8	
	November	50,6 $\pm$ 3,5	51,8 $\pm$ 3,2	46,9 $\pm$ 2,3	
Uric Acid (mg/dl)	March	6,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	5,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	p < 0.01
	August	4,9 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	5,2 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	
	November	4,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	5,5 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	5,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	

**Table 2** – Analysis of the acute effects of enzyme marker of injury in athletes at rest, and 15 minutes and 5 hours after exercise, during a futsal season. Means followed by same letters are not statistically different to each other at a significance level of ( $p > 0,05$ ) by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

		<b>rest</b>	<b>15 minutes after training</b>	<b>5 hours after training</b>	<b>p</b>
CK-mb (U/L)	March	26,7±1,8	24,9±1,6	20,0±1,5	NS
	August	16,3±1,9	10,5±1,2	12,7±1,3	
	November	18,1±1,3	23,5±1,2	20,2±1,6	
Ck-total (U/L)	March	376,6±38,5 <sup>a</sup>	419,6±32,4 <sup>a</sup>	488,9±37,5 <sup>b</sup>	p < 0.01
	August	284,9±29,5 <sup>c</sup>	355,6±26,0 <sup>a</sup>	355,8±17,1 <sup>a</sup>	
	November	276,4±24,2 <sup>c</sup>	342,9±33,6 <sup>a</sup>	349,6±33,0 <sup>a</sup>	
LDH (U/L)	March	386,4±32,7 <sup>a</sup>	363,0±33,4 <sup>b</sup>	485,7±35,6 <sup>a</sup>	p < 0.01
	August	388,4±21,2 <sup>a</sup>	302,2±7,0 <sup>b</sup>	249,1±9,9 <sup>c</sup>	
	November	404,7±31,0 <sup>a</sup>	366,3±20,6 <sup>b</sup>	213,4±22,1 <sup>c</sup>	

**Table 3** – Analysis of acute markers of oxidative damage in athletes at rest, and 15 minutes and 5 hours after exercise, during a futsal season. Means followed by same letters are not statistically different to each other at a significance level of ( $p > 0,05$ ) by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

		<b>rest</b>	<b>15 minutes after training</b>	<b>5 hours after training</b>	<b>p</b>
<b>TBARS</b> ( $\eta$ M/mg protein)	March	0,09 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	p <0.01
	August	0,24 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,29 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,27 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	
	November	0,34 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	
<b>Protein carbonyl</b> ( $\eta$ Mol/g protein)	March	0,96 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,36 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,06 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	p <0.01
	August	1,95 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,59 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,52 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	
	November	4,71 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	5,28 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	4,88 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	
<b>ALA-D</b> ( $\mu$ mol PBG/hora/g protein)	March	0,92 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	1,61 $\pm$ 0,38 <sup>c</sup>	0,84 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	p <0.01
	August	0,16 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,13 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	
	November	0,65 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	0,77 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	0,52 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	

**Table 4** – Analysis of acute markers of oxidative stress in athletes at rest, and 15 minutes and 5 hours after exercise, during a futsal season. The results are expressed as  $\pm$  S.E.M. Means followed by same letters are not statistically different to each other at a significance level of ( $p > 0,05$ ) by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

		<b>rest</b>	<b>15 minutes after training</b>	<b>5 hours after training</b>	<b>p</b>
Catalase Activity (U/mg protein)	March	0,25 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,39 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	p <0.01
	August	0,28 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,59 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	
	November	0,24 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,20 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	
Oxidized Vit C ( $\mu$ g/g protein)	March	20,95 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	22,41 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	23,71 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	p <0.01
	August	15,96 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	17,34 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	16,31 $\pm$ 0,77 <sup>b</sup>	
	November	16,23 $\pm$ 2,18 <sup>b</sup>	17,13 $\pm$ 3,54 <sup>b</sup>	12,82 $\pm$ 2,03 <sup>b</sup>	
Reduced Vit C ( $\mu$ g/g protein)	March	7,05 $\pm$ 1,47	5,95 $\pm$ 1,14	5,69 $\pm$ 1,07	NS
	August	4,34 $\pm$ 1,38	3,83 $\pm$ 0,88	4,75 $\pm$ 0,72	
	November	5,64 $\pm$ 0,4	5,98 $\pm$ 0,86	6,62 $\pm$ 0,56	
Total Vit C ( $\mu$ g/g protein)	March	31,79 $\pm$ 4,36 <sup>a</sup>	24,80 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	27,32 $\pm$ 1,87 <sup>a</sup>	p <0.01
	August	19,56 $\pm$ 1,35 <sup>a</sup>	21,04 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	19,94 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	
	November	66,02 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	80,59 $\pm$ 5,32 <sup>b</sup>	82,27 $\pm$ 2,66 <sup>b</sup>	
Total Phenolic Compounds (nmol)	March	3,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	4,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	p <0.01
	August	3,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	5,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	
	November	10,1 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	9,1 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	7,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	
Total SH ( $\mu$ mol)	March	49,06 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	50,29 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	55,01 $\pm$ 2,93 <sup>a</sup>	p <0.01
	August	59,55 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	55,80 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	53,59 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>	
	November	133,46 $\pm$ 21,0 <sup>b</sup>	136,27 $\pm$ 19,9 <sup>b</sup>	146,18 $\pm$ 1,51 <sup>b</sup>	

Non protein SH ( $\mu\text{mol}$ )	March	$27,67 \pm 0,87^a$	$26,45 \pm 1,17^a$	$42,10 \pm 1,92^b$	p <0.01
	August	$39,48 \pm 1,94^b$	$34,17 \pm 1,81^b$	$18,27 \pm 1,04^c$	
	November	$14,84 \pm 2,24^c$	$15,79 \pm 2,33^c$	$14,90 \pm 1,34^c$	
NOS ( $\eta\text{mol/L}$ )	March	$5,50 \pm 0,13^a$	$5,76 \pm 0,21^a$	$5,87 \pm 0,19^a$	p <0.01
	August	$22,20 \pm 0,63^b$	$21,22 \pm 0,74^b$	$19,66 \pm 0,50^b$	
	November	$5,72 \pm 0,22^a$	$6,94 \pm 1,19^a$	$5,63 \pm 0,28^a$	



### Parte 3. Discussão

São evidentes os benefícios que o exercício promove em nossa saúde, para tanto, dispomos de uma vasta bibliografia disponível comprovando a estreita relação entre a prática de exercícios regulares e uma menor prevalência de eventos mórbidos relacionada ao envelhecimento e doenças crônicas como o diabetes (Guedes e Gonçalves, 2007; Katzmarzyk *et al*, 2004; Bassuk e Manson , 2003).

Por outro lado, o esporte de elite tem levado muitos atletas aos limites da superação humana, transformando a prática esportiva salutar em uma ferramenta de agressão à homeostase metabólica destes indivíduos (De Rose Jr, 2002; Hanton *et al*, 2004).

A análise dos resultados elencados nos capítulos anteriores mostra que muito pode se descobrir das respostas bioquímicas dos atletas durante uma sessão de treinamento. No entanto, o caminho a ser seguido nesta linha está longe de apresentar uma conclusão definitiva. Dentre as dificuldades encontradas está a incerteza na diferenciação de alterações fisiológicas típicas de um aumento na taxa metabólica induzidas pelo esforço, daquelas alterações potencialmente patológicas.

As alterações metabólicas induzidas pelo exercício de resistência são típicas e muitas vezes o atleta se adapta à essas alterações. As maiores alterações estão relacionadas principalmente com a temperatura, duração e grau de hidratação do indivíduo (Wu *et al*, 2004; Sawka and Montain 2002; Reid *et al*, 2004; Mastaloudis *et al* 2004)

Por outro lado, a alteração metabólica induzida pelo exercício de força tem merecido uma atenção especial pela comunidade científica uma vez que são sensíveis à intensidade de trabalho, muitas vezes de forma súbita, que impede uma

adaptação metabólica eficaz, suscetibilizando num maior risco de rompimento de fibras musculares, inflamação, estresse oxidativo e conseqüentemente lesão muscular (Valko *et al*, 2007; Thompson *et al*, 2001; McMillan *et al* 2005; Edge 2005).

Como previsto e já descrito na literatura (Wu *et al*, 2004; Sawka and Montain 2002; Reid *et al*, 2004; Mastaloudis *et al* 2004; Valko *et al*, 2007; Thompson *et al*, 2001; McMillan *et al* 2005; Edge 2005), a análise da função renal, mediante a realização do exame de urina dos atletas em diferentes condições de esforço, aponta que está diretamente relacionada com o grau de hidratação dos indivíduos. Ou seja, a prática de exercício de resistência e de longa duração como a meia maratona, induziu a um maior grau de perda hídrica não renal, e conseqüentemente modificando significativamente o perfil urinário quando comparado com os esportes de esforço intermitente. A análise de parâmetros bioquímicos urinários após o exercício de resistência e de longa duração apontou um aumento de ácido úrico urinário (93,3%), turbidez na urina (100%), cilindros urinários (1.700%), filamento de muco (100%) estando diretamente relacionada com o aumento da perda hídrica não renal. A diminuição do fluxo urinário e o possível impacto induzido pelo exercício podem ter contribuído para mimetizar um quadro inflamatório/sangramento caracterizado pelo aumento de leucócitos urinários (250%), proteínas urinárias (100%) e hemoglobina/sangue (180%).

O comparativo do perfil hematológico dos diferentes protocolos mostra que a adaptação hematopoiética pode estar relacionada diretamente à resposta hormonal ditada pela intensidade e duração do exercício realizado. Os resultados elencados anteriormente nos capítulos I, II e III, mostram que a leucocitose, neutrofilia acompanhada de linfocitopenia e eosinopenia, parecem ser um padrão de resposta clássico. De fato, a regulação exercida por citocinas (TNF, INF, ILs) e hormônios

(epinefrina, cortisol, GH), bem como a proporção entre eles irão caracterizar as maiores ou menores alterações hematopoiéticas (Wu *et al*, 2004; Thompson *et al* 2001; Reid *et al* 2004; Pyne *et al* 2000, Pitsis *et al*, 2004). Dadas essas características, os resultados mostram que a meia maratona induziu a alterações mais intensas quando comparada com o exercício intermitente. Esse encontro pode estar relacionado com a modificação volêmica destes atletas caracterizada pelo aumento da perda hídrica não renal (comprovada pela análise da urina). Além disso, a temperatura pode ter sido uma variável muito importante. Segundo Saynajakangas *et al* (2001) e Toyoshima *et al* (2005) o frio afeta significativamente o sistema imune e conseqüentemente predispõe a um aumento da prevalência de doenças respiratórias. Em virtude da adaptação ao cronograma dos atletas, os testes dos maratonistas foram realizados a uma temperatura ambiente de 5°C, contra 15°C e 28°C dos atletas de futsal (capítulo 1 e 2 respectivamente), o que pode justificar as alterações mais evidentes nesse grupo de atletas.

A análise do perfil de marcadores enzimáticos de lesão muscular aponta incrementos significativamente maiores nos atletas de maratona quando comparado com os atletas de esforço intermitente. Os fundistas apresentaram incrementos de CK mb (55,2%), CK mm (181,5%), CK total (133,5%) 15 minutos após a prova. Conforme Echegaray e Rivera (2001), o pico de atividade as enzimas após uma lesão tecidual é de 24-60 horas após o evento mórbido. De fato, a intensidade da meia maratona nas condições climáticas realizadas, pode ter contribuído para modificar o padrão de enzimas logo em 15 minutos após a prática esportiva. Esse fator pode ter sido determinante dado o relato dos atletas após a competição, que se queixavam de que sua musculatura parecia estar “rasgando” após a prova.

A escolha da realização dos testes quase imediatamente após o esforço seria uma alternativa à disponibilidade dos atletas em virtude de seu cronograma de treino, concentração e competições. No entanto, no esforço intermitente, a determinação de marcadores enzimáticos de lesão 15 minutos após o término do esforço pareceu inadequado para conclusões consistentes. Justamente por conta da intensidade do treinamento e o tempo de liberação da enzima tecidual, combinada com sua respectiva velocidade de “*turn over*” (Echegaray & Rivera, 2001).

Amplamente divulgado na literatura, os benefícios do exercício sobre o metabolismo lipídico, e conseqüentemente à prevenção de eventos aterotrombóticos são evidentes. Bounds *et al* (2000) e Sunami *et al* (1999) preconizam que principalmente o exercício aeróbico contribuiria para melhora do perfil lipídico. De fato, comprovou-se que independente do exercício ser de resistência ou intermitente, houve um incremento de HDLc e de Colesterol de 9,6% e 24,1% respectivamente. No entanto, corroborando os dados apresentados por Bounds *et al* (2000) e Sunami *et al* (1999), o exercício intermitente não modificou significativamente as concentrações de LDLc e triglicerídeos, considerados fatores de risco para doença cardiovascular. A suplementação com chocolate no exercício intermitente pareceu modificar pouco o padrão de resposta do perfil lipídico, aliás, promoveu um aumento de 31% na concentração de triglicerídeos comparada com o repouso. Esse aumento pode estar relacionado ao alto teor lipídico contido no chocolate. O exercício de resistência realizado, promoveu uma redução de 29,2% na concentração de LDL e de 19,5% na concentração de triglicerídeos, corroborado com estudos de Ziogas *et al* (1997) que comprovaram que treinamento aeróbico de resistência pode ser necessário para reduzir os níveis de LDL e de triglicerídeos.

A análise da concentração de ferro sérico e do índice de saturação da transferrina nos atletas de resistência mostrou um aumento de 22,6 e 33,3%, respectivamente. A hiperatividade da cadeia de transporte de elétrons associado a um variável grau de hemólise pode promover um extravasamento de proteínas ricas em ferro (citocromos por exemplo). Os valores abaixo da normalidade tanto em repouso, como após a meia maratona em indivíduos com valores de hemoglobina dentro da faixa de normalidade, pode estar relacionado a primeira fase de instalação de um processo anêmico. A fase seguinte se caracterizará por reduções importantes da hemoglobina, hematócrito e da eritrometria. Isto sugere que mesmo com níveis normais de hemoglobina, os atletas analisados já apresentam um balanço negativo de ferro, caracterizando uma anemia do atleta e não um quadro de hemodiluição (Mateo e Laínez, 2000). A análise do metabolismo do ferro nos atletas de futsal não foi realizada por questões logísticas.

O acompanhamento dos atletas de futsal durante a temporada (série ouro da liga nacional) mostrou que o esforço induziu a importantes adaptações no sistema antioxidante. Considerando que o exercício físico pode induzir a aumentos de até 20 vezes a utilização de oxigênio e que em torno de 2 a 5% deste  $O_2$  pode originar ERO (Jenkins & Goldfarb, 1993), era de se esperar essas adaptações. De fato, a elevação de TBARS e carbonilação de proteínas, aliada a um decréscimo da concentração de ácido úrico e de grupamentos SH não protéicos, sugere um progressivo quadro de estresse oxidativo no decorrer da temporada. Assim, a medida de grupamentos sulfidril totais (GS) e a atividade da ALA-D (enzima rica em resíduos de cisteína) podem fornecer uma análise indireta do ataque oxidativo a proteínas plasmáticas, enquanto a medida de grupamentos SH não protéicos permite uma estimativa da atividade da glutatona.

No entanto, cabe ressaltar que após a segunda análise, os atletas entram em recesso de 30 dias, retornando às atividades normais após esse período. Esse período de repouso refletiu diretamente na atividade de enzimas CAT e ALA-D. Os resultados mostram uma curva côncava, cujo ápice apresenta-se no meio da temporada. Sugerindo que neste mesmo ponto, a produção de EROs também pode ser intensa. Ao término do período de recesso, a atividade destas enzimas tornam a diminuir, mostrando a importância de um período de repouso para recuperação do atleta (Selamoglu *et al*, 2000).

O acompanhamento nutricional dos atletas pode ter contribuído significativamente para não agravar os danos oxidativos causado pelo excesso de treinamento. A alimentação balanceada, rica em frutas, pode ter influenciado diretamente na elevação dos níveis de compostos fenólicos totais e vitamina C total (associada a redução da vit C oxidada). Ingestão de proteínas pela alimentação pode ter contribuído com a elevação de grupamentos SH totais e proteínas totais, uma vez que boa parte das proteínas plasmáticas apresentam resíduos de cisteína (com grupamentos sulfidril livres), que são passíveis de oxidação via radicais livres. Por esse motivo, pode-se dizer que desempenham um importante papel de proteção no plasma.

Por outro lado, os resultados mostram que no decorrer da temporada a concentração de glicose e uréia não sofreu modificação significativa. Esse encontro permite sugerir que o protocolo de treinamento adotado não induzia a uma proteólise significativa, mantendo a integridade muscular e de força no decorrer da temporada.

## Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- O treino de intensidade moderada e de longa duração apresentou alterações maiores quando comparado com o de esforço intermitente. No entanto, como a intensidade dos dois treinamentos foi diferente, pode-se afirmar que as adaptações metabólicas foram relativamente proporcionais à intensidade do treinamento e não diretamente ao tipo de treino.
- O exercício de resistência pode suscetibilizar ao desenvolvimento da “anemia do atleta”, que é diferente da “pseudoanemia dilucional”, pois os níveis de hemoglobina estavam normais, mas com depleção de ferro e ferritina.
- O esforço moderado e de longa duração induziu a um grau de dano muscular mais intenso quando comparado com o exercício de força por conta da intensidade do treino e provavelmente da temperatura do dia frio no qual foi realizada a prova de meia maratona, mostrando a importância do clima na análise de parâmetros bioquímicos.
- A prática esportiva realizada a temperaturas superiores a 27°C induz a um variável desequilíbrio hidroeletrolítico, nestas condições, recomenda-se a reposição hídrica regular com bebidas isotônicas, alheia ao reflexo de sede do atleta.
- A análise aguda de parâmetros bioquímicos permite identificar a maior parte das adaptações metabólicas dos atletas após uma sessão de treinamento, mesmo com o conhecimento de que determinados parâmetros apresentam picos tardios.

- Os atletas de futsal desenvolveram um aumento de produção de ERO no decorrer da temporada, que não foi controlada pela alimentação e repouso.

Sugestão: Faz-se necessária o acompanhamento individual dos atletas, mediante análise e monitoramento de equipe multiprofissional constituída de preparadores físicos, nutricionistas, fisiologistas, fisioterapeutas, bioquímicos e médicos do esporte.



## **Perspectivas**

Os resultados aqui apresentados permitiram o diagnóstico de diversas condições clínicas que foram passíveis de intervenção individualizada. Foi o caso de suplementação terapêutica, sob acompanhamento médico, com sulfato ferroso dos maratonistas com depleção de ferro; repouso, mudança de cronograma e intensidade de treinamento dos atletas de FUTSAL; introdução de frutas e reposição eletrolítica individualizada em todos os atletas que realizam treino/competição em temperaturas superiores a 27°C.

Estudos apontam que o dano oxidativo causado pelo exercício pode apresentar caráter agudo e/ou crônico mediante dano protéico, por exemplo. Desta forma, este trabalho terá continuidade mediante análise de dano protéico pela medida de AGEs (Advanced Glycation End-products) como: Carboximetil lisina, Frutoselisina, Pentosidina, Pirralina, Imidazolona. Estes compostos são proteínas glicadas implicadas na indução de aterosclerose, nefropatia e hipertensão, passíveis de determinação por HPLC coluna troca iônica seguido de análise fluorimétrica.

Além disso, a continuidade deste estudo se dará mediante o desenvolvimento de um software que utilizará uma base de dados fornecida por diferentes profissionais envolvidos no acompanhamento dos atletas (fisiologistas, nutricionistas, treinadores, preparadores físicos, bioquímicos, fisioterapeutas e etc). Cada profissional criará sua base de dados baseada em informações de sua especialidade. O software, constituído de uma rede neural, poderá cruzar todas as informações compiladas a partir da base de dados. Com o cruzamento das informações, estes resultados serão convertidos em pontos (baseado num ranking de acordo com a intensidade/gravidade da alteração previamente estabelecida por

cada profissional) e em seguida, gráficos de desempenho e de resposta bioquímica a um determinado esforço/treinamento.

O desenvolvimento deste software permitirá a conversão de dados qualitativos em quantitativos compilados em um único foco: o desempenho e bem estar do atleta.

## Referências bibliográficas

1. Bangsbo J, Mohr M; Krstrup P. Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player. *J Sports Sci.* 2006; 24 (7): 665 – 674
2. Bassit RA, Sawada LA, Bacurau RFP, Navarro F, Martins Jr E, Santos RVT, Caperuto EC, Rogeri P, Costa Rosa LFVP. Branched-chain amino acid supplementation and the immune response of long-distance athletes. *Nutrition.* 2002; 18 (5): 376-379.
3. Bassuk SS, Manson JE. Physical activity and cardiovascular disease prevention in women: how much is good enough? *Exerc Sport Sci Rev* 2003;31:176-181.
4. Bille K, Figueiras D, Schamasch P, Kappenberger L, Brenner JI, Meijboom FJ, Meijboom EJ. Sudden cardiac death in athletes: the Lausanne Recommendations. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2006; 13 (6): 859-875.
5. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA,* 2007; 297: 842 - 857.

6. Bloomer RJ, Falvo MJ, Fry AC, Schilling BK, Smith WA, Moore CA. Oxidative Stress Response in Trained Men following Repeated Squats or Sprints. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38(8):1436-1442.
7. Bounds RG, Grandjean PW, O'Brien BC, Inman C, Crouse SF. Diet and short term plasma lipoprotein-lipid changes after exercise in trained Men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2000; 10(2): 114-112.
8. Brites F, Verona J, De Geitere C, Fruchart J, Castro G, Wikinski R. Enhanced cholesterol efflux promotion in well-trained soccer players. *Metabolism.* 2004; 53(10): 1262-7.
9. Brito CJ and Marins JCB. Caracterização das práticas sobre hidratação em atletas da modalidade de judô no estado de Minas Gerais. *Rev Bras Ci e Mov.* 2005; 13(2): 59-74.
10. Bronzatto HA, Silva RP, Stein R. Morte súbita relacionada ao exercício. *Rev Bras Med Esporte.* 2001; 7(5): 163-169.
11. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 5119-5123.
12. De Rose Jr DA. Competição como fonte de estresse no esporte. *Rev Bras Ci e Mov* 2002; 10(4) 19-26.

13. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95.
14. Echeagaray M, Rivera MA. Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and cardiorespiratory endurance. Genetic and molecular evidence. *Sports Med.* 2001; 31(13): 919-934.
15. Edge J. Effects of High and Moderate - Intensity Training on Metabolism and Repeated Sprints. *Med Sci Sports Exerc.* 2005; 37(11): 1975-1982.
16. Fallon, KE. Utility of Hematological and Iron-Related Screening in Elite Athletes. *Clin J Sport Med.* 2004; 14(3):145-152.
17. Ghorayeb NC, Santos FE, Dioguardi G. Morte súbita de atletas: fato novo?. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 89(6): 169-170.
18. Guedes DP, Goncalves LAVV. Impact of the habitual physical activity on lipid profile in adults. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51(1): 72-78.
19. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Clarendon Press, Oxford (fourth edition), UK. 2007.

20. Hanton S, Thomas O, Maynard I. Competitive anxiety responses in the week leading up to competition: the role of intensity, direction and frequency dimensions. *Psychol Sport Ex.* 2004; 5: 169–181.
21. Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25: 210-12.
22. Jordão Júnior AA; Chiarello PG; Bernardes MSM, Vannucchi H. Peroxidação Lipídica e Etanol: Papel da Glutathione Reduzida e da Vitamina E. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 1998; 31: 434-449.
23. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods.* 2009; 1(2):41-60
24. Katzmarzyk PT, Church TS and Blair SN. Cardiorespiratory fitness attenuates the effects of the metabolic syndrome on all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Arch Intern Med.* 2004; 164:1092-1097.
25. Kenney WL. Requerimentos nutricionais de água e sódio para adultos ativos. *Sports Sci Exchange.* 2004; 17(1): 92.
26. Mara LS, Lemos R, Brochi L, Rohlf's ICPM, Carvalho T. Alterações hidroeletrolíticas agudas ocorridas no Triatlon Ironman Brasil. *Rev Bras Med Esporte.* 2007; 13(6): 397-401.

27. Maresh CM, Gabaree-Boulant CL, Armstrong LE, Judelson DA, Hoffman JR, Castellani JW, Kenefick RW, Bergeron MF, Casa DJ. Effect of hydration status on thirst, drinking, and related hormonal responses during low-intensity exercise in the heat. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 39-44.
28. Marins JCB, Dantas EHM and Navarro SZ. Diferentes tipos de hidratação durante o exercício prolongado e sua influência sobre o sódio plasmático. *Rev Bras Ci e Mov.* 2003; 11(1): 13-22.
29. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S and Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Rad Biol Med.* 2004; 36:1329-1341.
30. Mateo RJN, Laínez MGL. Anemia do atleta: fisiopatologia do ferro. *Rev Bras Med Esporte.* 2000; 6(3): 108-114.
31. Maughan R, Gleeson M and Greenhaff PL. *Bioquímica do exercício e do treinamento*, 1a Ed., São Paulo: Manole; 2000.
32. McArdle WD, Katch FI and Katch VL. *Fisiologia do exercício. Energia nutrição e desempenho humano.* 4ª ed. Editora Guanabara Koogan, 1998.

33. McKenna MJ, Bangsbo J and Renaud JM. Muscle K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup> disturbances and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump inactivation: implications for fatigue. *J Appl Physiol*. 2008; 104: 288-295.
34. McMillan K, Helgerud J, Macdonald R, Hoff J. The physiology of soccer - with special reference to intense intermittent exercise. *Acta Physiol Scand*. 1994; 151: S619.
35. McMillan K, Kelgerud J, Macdonald R and Hoff J. Physiological adaptations to soccer specific endurance training in professional youth soccer players. *Br J Sports Med*. 2005; 39: 273–277.
36. Moncada S, Higgs A. Nitric oxide: role in human disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001. Disponível em [www.els.net](http://www.els.net) em 20 dez 2008.
37. Olchawa B; Kingwell BA, Hoang A, Schneider L, Miyazaki O, Nestel P, Sviridov D. Physical Fitness and Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:1087-1091.
38. Panissa VLG, Bertuzzi RCM, Lira FS, Júlio UF, Franchini E. Exercício concorrente: análise do efeito agudo da ordem de execução sobre o gasto energético total. *Rev Bras Med Esporte*. 2009; 15(2) :127-131.



39. Pitsis GC, Fallon KE, Fallon SK, Fazakerley R. Response of soluble transferrin receptor and iron related parameters to iron supplementation in elite, iron depleted, nonanemic female athletes. *Clin J Sport Med.* 2004; 14(5): 300-305.
40. Pyne DP, McDonald WA, Morton DS, Swiggett JP, Foster M, Sonnenfeld G, Smith JA. Inhibition of Interferon, Cytokine, and Lymphocyte Proliferative Responses in Elite Swimmers with Altitude Exposure. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20(4): 411-418.
41. Reid SA, Speedy DB, Thompson JM, Noakes TD, Mulligan G, Page T, Campbell RG, Milne C. Study of hematological and biochemical parameters in runners completing a standard marathon. *Clin J Sport Med.* 2004; 14(6):344-353.
42. Reilly, T. Energetics of high-intensity exercise (soccer) with particular reference to fatigue. *J Sports Sci.* v. 15, p. 257-263, 1997
43. Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci.* 1991; 80: 611-618.
44. Sawka MN, Montain SJ. Fluid electrolyte supplementation for exercise heat stress. *Am J Clin Nutr.* 2002; 72: 564-572.

45. Saynajakangas P, Keistinen T, Tuuponen T. Seasonal fluctuations in hospitalisation for pneumonia in Finland. *Int J Circumpolar Health*. 2001; 60(1):34-40.
46. SBME. Dietary changes, water replacement, food supplements and drugs: evidence of ergogenic action and potential health risks. *Rev Bras Med Esporte*. 2009; 3 (15): suppl 2-12 .
47. Selamoglu S, Turgay F, Kayatekin BM, Gonenc S, Yslengen C. Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. *Acta Physiol Hung*. 2000; 87(3): 267-273.
48. Shrivastava P, Pantano C, Watkin R, McElhinney B, Guala A, Poynter ML, Persinger RL, Budd R, Janssen-Heininger Y. Reactive Nitrogen Species-Induced Cell Death Requires Fas-Dependent Activation of c-Jun N-Terminal Kinase. *Mol Cell Biol*. 2004; 15: 6763–6772.
49. Schneider CD And Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte* 2004; 10(4): 308-313
50. Sunami Y, Motoyama M, Kinoshita F, Mizooka Y, Sueta K, Matsunaga A, Sasaki J, Tanaka H, Shindo M. Effects of low-intensity aerobic training on the high-density lipoprotein cholesterol concentration in healthy elderly subjects. *Metabolism*. 1999; 48(8): 984-988.

51. Thompson HS, Scordilis SP, Clarkson PM, Lohrer WA. A single bout of eccentric exercise increases HSP27 and HSC/HSP70 in human skeletal muscle. *Acta Physiol.* 2001, 171(2):187-193.
52. Toyoshima M, Tadashi K, Ito GM, Gouveia N. Morbidade por doenças respiratórias em pacientes hospitalizados em São Paulo/SP. *Rev Assoc Med Bras.* 2005; 51(4): 209-213.
53. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39 (1): 44-84.
54. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Miñana JB, Pallardó FV, et al. Free radical in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2000;50:271-
55. Weineck J. *Treinamento Ideal*. 9ª edição. São Paulo: Editora Manole, 1999.
56. Williams BD, Wolfe RR, Bracy DP and Wasserman DH. Gut proteolysis contributes essential amino acids during exercise. *Am J Physiol.* 1996; 270: 85-90.
57. Wilmore JH and Costill DL. *Fisiologia do esporte e do exercício*. 2ª ed. São Paulo. Editora Oboré, 1987.

58. Wu HJ, Chen, KT, Shee BW, Chang HC, Huang YJ, Yang RS. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(18): 2711-2714.
59. Ziogas GG, Thomas TR, Harris WS. Exercise training, postprandial hypertriglyceridemia, and LDL subfraction distribution. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29: 986-991.
60. Zoller H, Vogel W. Iron supplementation in athletes first does no harm. *Nutrition.* 2004; 20 (7): 615-619.