

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E DANÇA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO
HUMANO

**EQUILÍBRIO HÍDRICO E BALANÇO REDOX DURANTE
EXERCÍCIO NO CALOR EM HUMANOS: O PAPEL DOS
ERITRÓCITOS NA DEFESA ANTIOXIDANTE**

DENISE DE MELO MARINS

PORTO ALEGRE - RS
2019

EQUILÍBRIO HÍDRICO E BALANÇO REDOX DURANTE EXERCÍCIO NO CALOR EM HUMANOS: O PAPEL DOS ERITRÓCITOS NA DEFESA ANTIOXIDANTE

DENISE DE MELO MARINS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Dança da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências do Movimento Humano.

Orientador: Dr. Alvaro Reischak de Oliveira

PORTO ALEGRE - RS
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Marins, Denise de Melo
EQUILÍBRIO HÍDRICO E BALANÇO REDOX DURANTE
EXERCÍCIO NO CALOR EM HUMANOS: O PAPEL DOS ERITRÓCITOS
NA DEFESA ANTIOXIDANTE / Denise de Melo Marins. --
2019.
87 f.
Orientador: Alvaro Reischak Oliveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Escola de Educação Física, Programa de
Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. hidratação. 2. hipertermia. 3. antioxidante. 4.
glutaciona. 5. estresse oxidativo. I. Oliveira, Alvaro
Reischak, orient. II. Título.

Denise de Melo Marins

**EQUILÍBRIO HÍDRICO E BALANÇO REDOX DURANTE
EXERCÍCIO NO CALOR EM HUMANOS: O PAPEL DOS
ERITRÓCITOS NA DEFESA ANTIOXIDANTE**

Conceito final:

Aprovado em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gabriela Tomedi Leites - ANHANGUERA

Prof. Dr. Maurício da Silva Krause - UFRGS

Prof. Dr. Eurico Nestor Wilhelm Neto - UFRGS

Orientador - Prof. Dr. Alvaro Reischak de Oliveira - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Na finalização deste trabalho e de mais esse momento especial da minha vida não poderia deixar de expressar a minha GRATIDÃO as pessoas que estiveram ao meu lado nessa jornada, especialmente a todos que no Rio Grande do Sul participaram efetivamente desse processo.

Inicialmente, agradeço a Deus por permitir que eu vivencie mais esse momento.

Aos meus pais, Sônia e Fabiano, e a minha irmã, Louise, pelo incentivo, dedicação, paciência e amor incondicional. Aos meus amigos de longa data, especialmente a Yngrid, pelo incentivo, paciência e amor de sempre.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Alvaro Reischak de Oliveira, com uma palavra que resume e ao mesmo tempo expressa todas as oportunidades e demonstrações de compreensão e carinho, CONFIANÇA. Sei o quanto foi difícil tomar uma decisão. Certamente essa demonstração de confiança foi imprescindível para meu crescimento profissional e principalmente pessoal. Muito obrigada por acreditar, professor!

Ao meu amigo e orientador da vida, (Prof. Orlando) Laitano, pela insistência, incentivo, paciência, inúmeros ensinamentos e experiências ao longo desses quase dez anos de convívio. A conclusão deste trabalho demonstra toda a tua dedicação. Obrigada por oportunizar conviver com a tua família, Dona Silvia, Kity e seu Orlando. Especialmente a Dona Silvia e Kity, deixo meu agradecimento, por todo amor e dedicação.

Um agradecimento especial aos meus colegas e amigos do GEFEX, Juliano Farinha, Francesco Boeno, Cesar Moritz, Thiago Ramis, Alexandra Vieira, Josianne Krause, Rodrigo Macedo, Salime Lisboa, Samuel Munhoz, Gabriela Santos, Rodrigo Leal, Rodrigo Quevedo, Jéssica Queiroz, Emerson, pelos ensinamentos, parceria, profissionalismo e principalmente pela amizade.

Aos professores do PPGCMH/UFRGS, especialmente à Maurício Krause, Gabriela Leites, Giovani Cunha que contribuíram imensamente para a realização desse trabalho.

Aos colegas e funcionários do PPGCMH pela disposição, parcerias e competências.

Aos funcionários do LAPEX, que de maneira muito particular me acolheram e me incentivaram. Tenho imenso carinho por todos.

Aos voluntários desta pesquisa por toda paciência, dedicação, compreensão. Sem vocês não seria possível realizar este trabalho.

À minha família da Cia Vital, eu não tenho palavras para agradecer. Especialmente, agradeço a André, Deborah e Paula por todo carinho, amor e dedicação.

Agradeço a todos que não foram citados, mas que também de alguma forma contribuíram muito.

“Tudo parece impossível até que seja feito.”

Nelson Mandela

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Capítulo I

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema representativo da hipertermia e da desidratação sobre o estresse oxidativo..... | 32 |
|--|----|

Capítulo II

| | |
|--|----|
| Figure 1 - Flow diagram of search and selection of studies..... | 41 |
| Table 1 - Studies that evaluated the effects of exercise associated with hyperthermia on oxidative stress parameters in euhydrated humans..... | 45 |
| Table 2 - Studies that evaluated the effects of exercise associated with dehydration on oxidative stress parameters..... | 46 |

Capítulo III

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características físicas dos participantes (média \pm DP) (n=10) | 61 |
| Tabela 2 - Alterações na gravidade específica da urina (GEU), hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), volume plasmático (VP em %), massa corporal total (MC), taxa de sudorese (TxS), percentual de desidratação (Des), e temperatura retal (Tr), após 60 min de exercício durante as quatro condições experimentais. Dados em média e desvio padrão..... | 68 |
| Figura 1 - Ordem cronológica do teste incremental até exaustão..... | 62 |
| Figura 2 - Ordem cronológica das visitas experimentais..... | 64 |
| Figura 3 - Respostas da frequência cardíaca durante as visitas experimentais..... | 69 |
| Figura 4 - Efeitos do exercício realizado no calor e em ambiente termoneutro com ou sem desidratação sobre a glutathiona reduzida (A), glutathiona oxidada (B) e da razão GSH/GSSG (C) no repouso e após o exercício. Valores em média \pm DP..... | 71 |
| Figura 5 - Efeitos do estresse térmico isolado nos eritrócitos sobre os valores de glutathiona reduzida (A), glutathiona oxidada (B) e da razão GSH/GSSG (C) no plasma..... | 72 |

Figura 6 - Efeitos do estresse térmico isolado nos eritrócitos sobre os valores de glutathiona reduzida (A), glutathiona oxidada (B) e da razão GSH/GSSG (C) na papa de hemácias..... 73

LISTA DE ABREVIATURAS

ERO (ROS - inglês) – Espécies reativas de oxigênio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

SOD – Superóxido dismutase

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

CAT – Catalase

GSH – Glutathione reduzida

URA – Umidade relativa do ar

RL – Radicais livres

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

O₂^{•-} - Radical superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

H₂O – Água

Fe – Ferro

Cu – Cobre

NO – Óxido nítrico

GSSG – Glutathione oxidada

EO (OS - inglês) – Estresse oxidativo

VO_{2max} – Consumo máximo de oxigênio

LT – Limiar de lactato

Iso – Isoprostanos

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

MDA – Malonaldeído

CARB – Carbonilas

PON1 – Paraoxonase 1

8-OHdG - 8-hidroxi-2- deoxiguanosina

LOOH - Hidroperóxidos de lipídios

TEAC - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox

FRAP - Potencial de redutor do ferro

LPO – Lipoperoxidação

VO_{2pico} – Consumo de oxigênio de pico

DEXA - Densitometria por dupla emissão de raios-X

T-EU – Condição termoneutro sem desidratação

T-DE – Condição termoneutro com desidratação

C-EU – Condição calor sem desidratação

C-DE – Condição calor com desidratação

MRP 1 - Proteína associada à resistência a múltiplas drogas 1

Htc – Hematócrito

Hb – Hemoglobina

GEU – Gravidade específica da urina

VP – Volume plasmático

MC – Massa corporal

TxS – Taxa de sudorese

Des – Percentual de desidratação

Tr – Temperatura retal

DP – Desvio padrão

RESUMO

Introdução geral: Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas e suscetíveis a interagirem e modificarem com outras moléculas. Além dos radicais livres, existem as espécies reativas de oxigênio (ERO) que em níveis elevados podem promover desequilíbrio redox, responsável por comprometer a estrutura e o funcionamento celular. Dessa forma, mecanismos de defesa antioxidante agem para reduzir o estresse oxidativo provocado pelo desequilíbrio entre agentes pró e antioxidantes em favor do pró - oxidantes. A glutathiona (GSH) é um importante sistema de defesa antioxidante. O exercício físico induz a formação de ERO e desse modo gera modificações no metabolismo da GSH. Ao mesmo tempo, a hipertermia e desidratação também são apontadas por contribuir no metabolismo da GSH. No entanto ainda não está claro, além das fontes já conhecidas de liberação de GSH (hepatócitos) se outros tecidos, como os eritrócitos, contribuem nos níveis circulantes de GSH.

Objetivo revisão sistemática: Avaliar as respostas de marcadores pró e antioxidantes do exercício associado a hipertermia e desidratação.

Métodos revisão sistemática: Foi realizada uma busca nas bases MEDLINE, Cochrane Wiley, Clinical Trials.gov, PEDRO e LILACS. Foram incluídos ensaios clínicos que investigaram indivíduos jovens saudáveis sobre as respostas pró e antioxidante do exercício associadas ao calor (hipertermia) e / ou exercício associado à desidratação. Dois revisores independentes extraíram os dados e avaliaram a qualidade dos estudos incluídos.

Resultados revisão sistemática: Um total de 1.014 artigos foram selecionados, nove artigos completos foram avaliados para elegibilidade, e oito artigos preencheram os critérios de inclusão. Estudos que investigam os efeitos do exercício associado a hipertermia indicam que o exercício no calor pode promover adaptações na defesa antioxidante, reduzindo os efeitos negativos do calor isolado sobre a resposta oxidativa. Por outro lado, estudos mostram que a desidratação induzida pelo exercício aumenta os marcadores pró-oxidantes e é atenuada pela reidratação.

Objetivos artigo original: Investigar os efeitos do exercício no calor com e sem desidratação (em humanos) e do estresse térmico isolado nos eritrócitos (in vitro) sobre o metabolismo da GSH.

Métodos artigo original: Dez homens fisicamente ativos realizaram exercício em quatro condições experimentais: termoneutro + euhidratação (T-EU); termoneutro + desidratação (T-DE); calor + euhidratação (C-EU); calor + desidratação (C-DE). As temperaturas das condições termoneutro e calor foram, respectivamente, de 23°C e 38°C. Os participantes realizaram exercício de intensidade moderada (60% VO₂pico) durante 60 minutos. A gravidade específica da urina foi analisada no início de cada visita. A frequência cardíaca e temperatura retal foram monitorados continuamente durante o exercício. Os registros da massa corporal para determinar o percentual de desidratação foram realizados pré e pós o exercício. Coletas de sangue foram realizadas para mensurar a glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) circulantes. Para a visita de coleta de sangue para realizar o aquecimento dos eritrócitos, o sangue foi coletado e separado em tubos, organizados nas condições de aquecimento: a 35°C e a 41°C. Após exposição ao calor, o plasma e os eritrócitos foram extraídos para análises de GSH e GSSG.

Resultados artigo original: Os resultados da temperatura corporal e do percentual de desidratação nas condições de exercício obtiveram aumentos significativos em todas as visitas. A frequência cardíaca teve aumento significativo nas condições calor comparada as condições termoneutro. A desidratação promoveu reduções significativas na GSH, independentemente da temperatura ambiente, resultando na alteração do balanço redox. Para os resultados da exposição isolada dos eritrócitos, o estresse térmico promoveu aumento dos níveis de GSH.

Considerações finais: O exercício de intensidade moderada no calor previne as alterações no balanço redox, na ausência de desidratação. Sugere-se que a manutenção do equilíbrio redox durante o exercício moderado no calor tem contribuição dos eritrócitos com a liberação de GSH.

Palavras-chave: hidratação, hipertermia, antioxidante, glutathiona, estresse oxidativo

ABSTRACT

General background: Free radicals are highly reactive atoms or molecules that are susceptible to interact and modify with other molecules. In addition to free radicals, there are reactive oxygen species (ROS) that at high levels may promote redox imbalance, which is responsible for compromising cell structure and function. Thus, antioxidant defense mechanisms act to reduce oxidative stress caused by the imbalance between pro and antioxidant agents in favor of pro-oxidants. Glutathione (GSH) is an important antioxidant defense system. Physical exercise induces the formation of ROS and thus generates changes in GSH metabolism. At the same time, hyperthermia and dehydration are also reported to contribute to GSH metabolism. However, it is not yet clear beyond the known sources of GSH (hepatocyte) release whether other tissues, such as erythrocytes, contribute to circulating levels of GSH.

Objective systematic review: The aim to verify the pro and antioxidant responses during exercise associated with hyperthermia and dehydration.

Methods systematic review: We searched MEDLINE, Cochrane Wiley, Clinical Trials.gov, PEDRO and LILACS. We included clinical trials that investigated healthy young individuals on the pro and antioxidant responses of exercise associated with heat (hyperthermia) and / or exercise associated with dehydration. Two independent reviewers extracted data and assessed the quality of the included studies.

Results systematic review: A total of 1,014 records were selected, nine full papers were evaluated for eligibility, and eight papers met the inclusion criteria. Studies investigating the effects of exercise associated with hyperthermia indicate that exercise in heat may promote adaptations in antioxidant defense, reducing the negative effects of isolated heat on the oxidative response. On the other hand, studies show that exercise-induced dehydration increases pro-oxidant markers and is attenuated by rehydration.

Objectives original article: The aims were to investigate the effects of exercise on heat with and without dehydration (in humans) and isolated thermal stress in erythrocytes (in vitro) on GSH metabolism.

Methods original article: Ten physically active men performed exercise under four trials: thermoneutral + euhydration (T-EU); thermoneutral + dehydration (T-

DE); heat + euhydration (H-EU); heat + dehydration (H-DE). The temperatures of the thermoneutral and heat conditions were, respectively, 23 °C and 38 °C. Participants performed moderate intensity exercise (60% VO₂peak) for 60 minutes. The specific gravity of urine was analyzed at the beginning of each trials. Heart rate and rectal temperature were monitored throughout trials. Body mass records to determine the percentage of dehydration were measured before and after exercise. Blood samples were taken to measure circulating reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). For the blood collection visit to warm the erythrocytes, the blood was collected and separated into tubes, organized under warming conditions: at 35 ° C and at 41 ° C . After exposure to heat, plasma and erythrocytes were extracted for GSH and GSSG analysis. Results original article: Results of body temperature and dehydration percentage under exercise conditions showed significant increases in all trials. Heart rate had a significant increase in heat conditions compared to thermoneutral conditions. Dehydration promoted significant reductions in GSH, regardless of ambient temperature, resulting in redox imbalance. For the results of isolated erythrocyte exposure, thermal stress promoted increased GSH levels.

Conclusions: Moderate exercise in the heat prevents changes in the redox balance, in the absence of dehydration. It is suggested that maintaining redox balance during moderate exercise in the heat has red blood cell contribution to GSH release.

Keywords: hydration, hyperthermia, antioxidants, glutathione, oxidative stress

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| APRESENTAÇÃO..... | 16 |
| 1 CAPÍTULO I | 17 |
| 1.1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.2 REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 1.2.1 EXERCÍCIO FÍSICO NO CALOR E DESIDRATAÇÃO..... | 20 |
| 1.2.2 RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO | 23 |
| 1.2.3 DEFESA ANTIOXIDANTE: GLUTATIONA..... | 25 |
| 1.2.4 EXERCÍCIO FÍSICO NO CALOR, DESIDRATAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO..... | 28 |
| 1.2.5 EXERCÍCIO FÍSICO NO CALOR E ESTRESSE OXIDATIVO..... | 28 |
| 1.2.6 DESIDRATAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO | 30 |
| 2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS..... | 33 |
| 2.1 PROBLEMA DE PESQUISA | 33 |
| 2.2 OBJETIVOS | 33 |
| 2.2.1 OBJETIVO GERAL | 33 |
| 2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 2.3 HIPÓTESES..... | 33 |
| 3 CAPÍTULO II: REVISÃO SISTEMÁTICA (EXERCISE, HEAT AND OSMOTIC STRESS: A SYSTEMATIC REVIEW WITH INSIGHTS FOR REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ANTIOXIDANT DEFENSE) | 35 |
| 4 CAPÍTULO III: ARTIGO ORIGINAL (DESEQUILÍBRIO REDOX INDUZIDO PELA DESIDRATAÇÃO DURANTE EXERCÍCIO NO CALOR) | 55 |
| 5 CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS | 77 |
| REFERÊNCIAS | 79 |
| APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 85 |

APRESENTAÇÃO

Esta tese foi desenvolvida a partir de questionamentos sobre as possíveis fontes de liberação da glutatona em condições de estresses fisiológicos. A associação entre exercício, calor e desidratação tem sido demonstrada como importantes fatores desafiadores da integridade e funcionalidade de diferentes tecidos. O desequilíbrio redox ocasionado por essa tríade tem sido bastante discutido na literatura, sendo a glutatona um importante marcador utilizado nessa investigação. Embora evidências demonstrem alterações da glutatona durante essas condições de estresse fisiológico, esta tese buscou compreender se há contribuição dos eritrócitos nessas alterações.

Para isso, esta tese foi estruturada da seguinte forma:

- 1) CAPÍTULO I: Uma introdução sobre o assunto apresentando o problema de pesquisa e uma revisão da literatura na qual foram abordados os principais achados sobre o tema da pesquisa.
- 2) CAPÍTULO II: Revisão sistemática intitulada: *“Exercise, heat and osmotic stress: a systematic review with insights for reactive oxygen species and antioxidant defense”*.
- 3) CAPÍTULO III: Artigo original intitulado: *“Desequilíbrio redox induzido pela desidratação durante exercício no calor”*.
- 4) CAPÍTULO IV: Considerações finais.

1 CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados na sua eletrosfera, tornando-os altamente reativos e suscetíveis a interagirem e modificarem com outras moléculas (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; FINAUD et al., 2006). Uma classe dos radicais livres são as espécies reativas de oxigênio (EROs) que são produzidas naturalmente por meio do metabolismo oxidativo celular (BENTLEY et al., 2014). Embora não apresentem elétrons desemparelhados, as EROs também apresentam alta reatividade. De fato, a formação de EROs está associada a alterações na estrutura e no funcionamento celular (POWERS; JACKSON, 2008). Por exemplo, a produção excessiva de EROs está vinculada a alterações em diferentes componentes celulares como lipídios, ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas (POWERS et al., 2004), participando da fisiopatologia de doenças como câncer (SOUTHRN; POWIS, 1988; GOLDEN et al., 2002), doença de Parkinson (GOLDEN et al., 2002), insuficiência cardíaca (LAITANO et al., 2016) entre outras. Além disso, as EROs promovem a fadiga muscular de músculos locomotores e respiratórios (REID et al., 1992a, 1992b). Por outro lado, em doses mais baixas, as EROs participam de importantes adaptações celulares ao exercício, como por exemplo, a expressão de um fenótipo oxidativo no músculo esquelético (POWERS et al., 2011; RISTOW et al., 2009) e o controle do volume celular em condições de estresse fisiológico (KING et al. 2016).

A manutenção do equilíbrio redox celular é atingida pelo ajuste fino entre agentes oxidativos (ex.: ERO) e redutivos (ex.: defesa antioxidante). De fato, mecanismos de defesa antioxidante agem para reduzir o estresse oxidativo provocado pelo desequilíbrio entre agentes pró e antioxidantes em favor de pró-oxidantes. A defesa antioxidante pode ser classificada em enzimática e não enzimática (FINAUD et al., 2006; BENTLEY et al., 2014). A defesa antioxidante enzimática inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e a catalase (CAT) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; POWERS; JACKSON, 2008). A defesa antioxidante não

enzimática inclui uma variedade de inibidores de formação de EROs, como vitaminas (A, C, E), flavonoides, tióis e micronutrientes que atuam como cofatores enzimáticos (FINAUD et al., 2006). A combinação entre os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos pode potencializar a defesa antioxidante, apesar da prática de exercício físico, a ingestão alimentar e o envelhecimento são fatores importantes que podem influenciar essas respostas (FINAUD et al., 2006).

Um importante sistema de defesa antioxidante não enzimático é o metabolismo da glutatona (GSH) (GOHIL et al., 1988). A GSH é classificada como um tiol e é abundantemente encontrada nas células (FINAUD et al., 2006). O papel da GSH dentro da defesa antioxidante envolve a sua capacidade de reagir com ERO doando um hidrogênio, assim como também, servindo de substrato para a ação da glutatona peroxidase, neutralizando os potenciais efeitos das ERO (POWERS; JACKSON, 2008). Alterações nos níveis de GSH em resposta a situações nas quais o estresse oxidativo está presente demonstram a sua importância como mecanismo de defesa antioxidante (INAYAMA et al., 2002; LAITANO et al., 2010; GOHIL et al., 1988; FINAUD et al., 2006, LAITANO et al. 2016). Os estímulos provocados pelo exercício físico agudo e crônico são exemplos de situação na qual ocorrem alterações nos níveis celulares e circulatórios de GSH (PARK; KWAK, 2016).

O exercício físico agudo é amplamente discutido por induzir estresse oxidativo (SOUZA-SILVA et al. 2016; PARK; KWAK, 2016), pois a contração muscular é uma das principais formas de produção de ERO (DAVIES et al., 1982; BAILEY et al., 2004). Ao mesmo tempo, fatores como hipertermia e desidratação também são apontados por contribuir na formação de ERO na circulação (LAITANO et al., 2010; LAITANO et al. 2012; KING et al., 2016) e intramuscular (ZUO et al., 2004; OLIVER et al., 2008) de maneira independente e combinada. Embora a hipertermia e a desidratação sejam associadas ao estresse oxidativo, respostas distintas são observadas quando elas estão associadas ao exercício. Por exemplo, Laitano et al. (2010) determinaram os efeitos combinados e separados do exercício e do estresse térmico sobre marcadores de estresse oxidativo e encontraram que o estresse térmico isolado, na ausência de exercício, promoveu estresse oxidativo, diferentemente de quando o estresse térmico esteve associado ao exercício. Na situação em

que o exercício foi combinado ao estresse térmico, houve maior resposta da defesa antioxidante permitindo a manutenção do balanço redox (LAITANO et al., 2010). Em estudos que investigaram a relação da desidratação sobre o estresse oxidativo, foi observado que a desidratação, induzida pelo exercício, aumenta a produção de ERO, porém não apresenta as mesmas adaptações observadas na combinação entre exercício e hipertermia quanto à resposta de defesa antioxidante (LAITANO et al. 2012; KING et al., 2016). Essas alterações circulatórias promovidas pela interação da tríade exercício, calor e desidratação podem ser reflexo da resposta dos eritrócitos ao estresse osmótico induzido pela tríade. Os eritrócitos são continuamente expostos a elevadas concentrações de oxigênio e ferro na hemoglobina e esses fatores tornam essas células sensíveis ao dano oxidativo (BERNABUCCI et al. 2002) o que, por sua vez, os faz um modelo apropriado para estudar o estresse oxidativo (KUSMIC et al. 2000). Assim, determinar os níveis eritrocitários de GSH em resposta a um desafio térmico *in vitro*, pode ser uma estratégia para determinar a contribuição dos eritrócitos sobre os níveis circulantes de GSH observados *in vivo*.

Embora esteja evidenciado o papel da GSH no balanço redox, ainda não está claro, se os eritrócitos são uma fonte de liberação da GSH circulante, especialmente em situações de estresse fisiológico como hipertermia e desidratação. Os estudos em humanos que verificaram o comportamento da GSH em situações de estresse fisiológico, como durante o exercício, mensuraram os níveis circulantes de GSH (GOHIL et al., 1988; LAITANO et al., 2010; LAITANO et al. 2012). Dessa forma, é possível especular que os valores de GSH mensurados na circulação possam ser influenciados por fontes eritrocitárias (GOHIL et al., 1988; LAITANO et al., 2010). Assim mensurar a liberação da GSH pelos eritrócitos isolados poderá determinar a contribuição dessas células na resposta antioxidante observada na circulação.

Portanto, o objetivo desta tese foi determinar os níveis circulatórios de glutathiona durante o exercício no calor com e sem desidratação em humanos (Experimento 1 – *in vivo*), bem como, a contribuição dos eritrócitos (de humanos) (Experimento 2 – *in vitro*) na liberação da glutathiona em resposta a exposição ao calor. Para isso foram propostos dois experimentos (um *in vivo* e um *in vitro*).

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 Exercício físico no calor e desidratação

O exercício físico realizado no calor está associado a alterações nas respostas fisiológicas em diferentes sistemas do corpo humano. Por exemplo, são observadas mudanças no comportamento do sistema cardiorrespiratório, termorregulatório, no sistema nervoso central e no sistema musculoesquelético mediante a prática de exercício em ambiente quente (NYBO, 2008; CHEUVRONT et al., 2010; RACINAIS et al., 2015). Dentre as diversas respostas relacionadas a prática de exercício no calor, está a elevação acentuada da temperatura corporal central. Esse aumento é causado pela associação entre a elevação do metabolismo muscular e as altas temperaturas ambientais (MAUGHAN; SHIRREFFS; WATSON, 2007), bem como, os altos índices de umidade relativa do ar, que pode resultar em um quadro conhecido como hipertermia (MAUGHAN; WATSON; SHIRREFFS, 2015).

A hipertermia é caracterizada pelo aumento da temperatura corporal central acima de valores fisiológicos. Registros superiores a 40°C são considerados como valores críticos da temperatura central, (SAWKA et al., 1992; MONTAIN et al., 1994), uma vez que em condições fisiológicas adequadas esse valor é de aproximadamente 37,5°C (SUND-LEVANDER; FORSBERG; WAHREN, 2002). Constantemente o corpo humano troca calor com o ambiente. Isso ocorre pela necessidade de manter a temperatura corporal dentro de faixas adequadas. No entanto, durante o exercício físico ocorre a produção metabólica de calor derivada da contração muscular. Essa produção de calor é dependente da intensidade da atividade muscular e resulta na necessidade do corpo de perder calor para o ambiente. Além disso, quando o ambiente se encontra mais aquecido que a pele (por exemplo, quando o exercício é praticado no calor), o ganho de calor corporal passa a ser maior do que a capacidade de perda. Assim, as implicações promovidas por esse desequilíbrio térmico podem surgir, alterando respostas fisiológicas como o equilíbrio redox (LAITANO et al., 2010, KING et al. 2016), o metabolismo cerebral (CRANDALL; GONZALÉZ-ALONSO, 2010; NYBO, 2008), bem como o sistema cardiovascular (GONZÁLEZ-ALONSO; CRANDALL; JOHNSON, 2008). Além

disso, observa-se que a hipertermia está associada a presença de confusão mental, perda de coordenação, alucinações, assim como, na disfunção sistêmica de vários órgãos (BOUCHAMA, KNOCHER, 2002).

Considerando os compartimentos corporais, a temperatura da pele é uma variável relevante relacionada à hipertermia (SCHLADER et al. 2011) e, desta forma, possui impacto sobre o desempenho na realização de exercício em ambientes quentes. Estudos têm demonstrado que o resfriamento prévio da superfície da pele apresenta melhores resultados no desempenho e nos valores de potência nos primeiros minutos do exercício aeróbio em ambiente quente e úmido (ROSS et al. 2011). Em um estudo clássico, González-Alonso et al. (1999) manipularam experimentalmente a temperatura corporal e verificaram que o resfriamento prévio do corpo, resultou em reduções na temperatura inicial esofágica, da pele e muscular, promovendo melhor desempenho durante exercício moderado até a exaustão realizado no calor. No entanto, quando o exercício tem um menor tempo de duração, parece não haver benefício no desempenho (LEVELS et al., 2012). Por exemplo, Levels et al. (2012) verificaram o efeito da temperatura da pele no desempenho de ciclista durante uma prova de 7,5 Km. Para isso, foi realizado um pré-resfriamento da pele em uma das sessões de exercício com exposição ao calor. Apesar de no início do exercício a temperatura da pele na condição pré-resfriamento ser menor, não foi observada vantagem no desempenho em comparação as situações nas quais não houve o pré-resfriamento.

Mediante o aumento gradativo da temperatura corporal central e na presença de estresse térmico, que é caracterizado pela elevada temperatura corporal, da pele e do ambiente, é imprescindível que ocorra a ativação de mecanismos termorregulatórios para promover a troca de calor. Dentre eles, a evaporação de suor emerge como a principal e a mais eficiente via de dissipação do calor no ambiente terrestre (SHIBASAKI; WILSON; CRANDALL, 2006). Entretanto, para que o suor evapore, é necessário que a umidade relativa do ar não esteja elevada (ex.: > 60%). Na presença de umidade relativa do ar (URA) elevada o mecanismo termorregulatório decorrente da evaporação do suor é prejudicado, impossibilitando a dissipação do calor (MAUGHAN; OTANI; WATSON, 2012).

Apesar da eficiência termorregulatória, a evaporação do suor está associada a redução do conteúdo de água corporal. Essa redução desencadeia o processo de desidratação, levando a um estado de hipoidratação (SAWKA et al., 2011). A manutenção de um estado de hidratação é fundamental para o funcionamento regular das funções fisiológicas, uma vez que o metabolismo celular, bem como a funcionalidade sistêmica, é dependente da adequada oferta de água dentro e fora das células. A produção de suor para a troca de calor é parcialmente dependente do volume plasmático. Quando ocorre redução no volume plasmático, observa-se o aumento da osmolaridade sanguínea e uma diminuição do volume total de sangue (SAWKA et al., 2011). Essas alterações implicam diretamente na diminuição da produção e excreção de suor, prejudicando a capacidade do corpo em trocar calor com o ambiente, e promovendo sobrecargas no sistema cardiovascular (GONZÁLEZ-ALONSO; CRANDALL; JOHNSON, 2008).

O estresse cardiovascular observado na prática de exercício físico no calor é mediado pela concorrência do fluxo sanguíneo entre a musculatura ativa e a pele (ROWELL, 1974). Durante o exercício ocorre um aumento da demanda de oxigênio e de nutrientes para o músculo esquelético ativo. Concomitantemente, existe um aumento do fluxo sanguíneo para a pele, devido a necessidade do corpo de dissipar calor por meio da sudorese. A reposição inadequada de líquidos associada a perda hídrica corporal promove um comprometimento no adequado enchimento cardíaco (ROWELL, 1986) provocando reduções no volume sistólico e conseqüentemente no débito cardíaco, refletindo diretamente na redução de oferta de sangue. O aumento compensatório da frequência cardíaca observado nessas situações normalmente é insuficiente para atender a demanda imposta em exercícios de resistência (GONZÁLEZ-ALONSO; CRANDALL; JOHNSON, 2008). Logo, é observada uma incapacidade do sistema cardiovascular de manter o fluxo sanguíneo muscular, bem como, de manter o fluxo sanguíneo da pele para favorecer a perda de calor.

Os aspectos destacados até o momento demonstram que as respostas fisiológicas (cardiovascular e termorregulatória) e o desempenho físico são dependentes de uma série de fatores, inclusive as condições ambientais (NYBO, 2008; RACINAIS, 2015). Embora a produção metabólica de calor seja independente das condições externas (temperatura ambiente e umidade

relativa do ar), é evidente que em situações de estresse térmico ambiental existe uma maior resposta compensatória sistêmica decorrente da maior obtenção de calor corporal (SAWKA et al., 2011; CHEUVRONT; KENEFICK, 2014). No entanto, os eventos compensatórios podem promover o desequilíbrio hídrico (MAUGHAN; WATSON; SHIRREFFS, 2015) e gerar efeitos fisiológicos negativos, principalmente quando a desidratação estiver associada à prática de exercício físico em ambiente quente.

1.2.2 Radicais livres de oxigênio e estresse oxidativo

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados na sua eletrosfera, tornando-os altamente reativos e suscetíveis a interagirem com outras moléculas, resultando na modificação estrutural e funcional dessas moléculas (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1990; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; FINAUD et al., 2006). Uma classe dos radicais livres são as espécies reativas de oxigênio (EROs) que são produzidas naturalmente por meio do metabolismo oxidativo celular (BENTLEY et al., 2014) e embora nem todas as EROs se classifiquem como RL, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LUSHCHAK, 2015), também apresentam alta reatividade que pode promover alterações estruturais e funcionais nas células (POWERS; JACKSON, 2008).

As EROs são produzidas continuamente por fontes exógenas (exposição a agentes poluentes) e por fontes endógenas (metabolismo oxidativo) (THOMAS et al., 2000). No metabolismo oxidativo cerca de 2 a 5% do oxigênio utilizado pela mitocôndria na cadeia transportadora de elétrons resulta na produção de EROs. As EROs de importância biológica incluem o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (FINAUD et al., 2006). Durante o metabolismo oxidativo, o oxigênio é utilizado comoceptor final de elétrons na cadeia transportadora, que ao receber quatro elétrons e quatro prótons é totalmente reduzido sendo convertido em duas moléculas de água (H_2O). No entanto, quando o oxigênio não sofre redução total (ou seja, não recebe quatro elétrons e quatro prótons) e é reduzido apenas com a adição de um elétron na sua molécula no estado fundamental é formado o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A partir da formação do $O_2^{\cdot-}$ se dá a formação do peróxido de

oxigênio (H_2O_2), que é gerado a partir da adição de um elétron e dois prótons ao $\text{O}_2^{\cdot -}$, reação essa que é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um próton é formado o radical hidroxila (OH^{\cdot}), conhecido por ser o radical mais reativo, capaz de reagir e modificar qualquer estrutura celular e alterar o funcionamento enzimático, de membranas e de ácidos nucleicos. A formação do OH^{\cdot} também pode ser derivada da reação do H_2O_2 com íons de ferro (Fe) ou cobre (Cu), reação conhecida como de Fenton, ou quando íons de metais catalisam a reação entre o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot -}$, reação chamada de Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1990; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; FINAUD et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, nem todos as EROs são radicais livres. Dentre as ERO citadas somente o $\text{O}_2^{\cdot -}$ e OH^{\cdot} são RL, enquanto que o H_2O_2 não é um RL (pois não possui elétron desemparelhado na sua eletrosfera). Embora, $\text{O}_2^{\cdot -}$, H_2O_2 e OH^{\cdot} não se classifiquem todos como RL, todos são caracterizados pela sua alta reatividade com biomoléculas e por isso são chamadas de ERO. Além das reações supracitadas geradoras de ERO, existem outras reações que promovem a geração de ERO como a reação entre o $\text{O}_2^{\cdot -}$ e o óxido nítrico (NO), radical livre centrado no nitrogênio, formando o peroxinitrito, que pode levar a formação de um radical com características semelhantes ao OH^{\cdot} (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; FINAUD et al., 2006).

A formação de ERO é notada de forma contínua no meio fisiológico. É observado um ajuste fino entre a formação de ERO (agentes pró-oxidantes) e a sua degradação (agentes antioxidantes) (LUSHCHAK, 2015). Esse ajuste entre moléculas pró e antioxidantes permite um estado de equilíbrio no meio fisiológico celular. Entretanto, quando esse equilíbrio é comprometido pode resultar na maior formação de ERO aumentando as suas concentrações no meio celular. O desequilíbrio entre agentes pró e antioxidantes a favor do pró-oxidantes resulta no que é conhecido como estresse oxidativo (SIES, 1986). O aumento transitório ou persistente de ERO é perturbador a homeostase celular, promovendo distúrbios ao núcleo e vias de sinalização da célula levando a modificações nos seus constituintes, que ao persistir, pode resultar na morte celular por necrose ou apoptose (LUSHCHAK, 2015).

Diante da necessidade de contrabalancear a formação de ERO as células possuem mecanismos de defesa antioxidante (YU, 1994). A defesa

antioxidante é definida como uma medida para reduzir os efeitos deletérios do estresse oxidativo seja na formação de um radical menos reativo ou evitando reações prejudiciais de RL em substratos como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (DEKKERS; VAN DOORNEN; KEMPER, 1996). O sistema de defesa antioxidante divide-se em enzimático e não enzimático (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; FINAUD et al., 2006). Os antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já o sistema não enzimático está dividido em compostos sintetizados pelo organismo humano, como por exemplo, bilirrubina, melatonina, coenzima Q, ou por compostos ingeridos por meio de dieta alimentar, como exemplos, vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), flavonoides e tióis (incluindo glutathione [GSH]) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; FINAUD et al., 2006).

1.2.3 Defesa antioxidante: Glutathione

A manutenção do estado redox intracelular é fundamental para o funcionamento regular das células. A glutathione funciona como um tampão do estado redox celular e como um antioxidante no músculo esquelético (LE MOAL et al., 2017). É um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos. Trata-se de um tripeptídeo constituído ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas. Existe, na maioria das células, em concentrações compreendidas entre 1 e 8 mM, estando, geralmente, na sua maior quantidade no fígado. Ao nível extracelular a concentração de glutathione é da ordem de 5-50 μ M. Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG, forma dimerizada da GSH). A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos. Uma vez que ocorra diminuição dessa razão um estado de estresse oxidativo é caracterizado. Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathione total (menos de 10%) (LE MOAL et al., 2017). Embora a GSH seja encontrada em abundância no citosol, é possível encontrar em algumas organelas celulares como, retículo endoplasmático, mitocôndria e núcleo (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). Ainda que a glutathione exerça outras

funções biológicas como síntese de prostaglandinas, manutenção de estruturas e funções proteicas, sua principal função é a manutenção do estado redox celular, agindo na proteção contra ERO (BANERJEE, 2007).

É evidenciado na literatura que o exercício físico induz a formação de ERO e desse modo gera modificações no metabolismo da GSH. Além disso, alguns estudos têm investigado as alterações das concentrações da GSH durante o exercício quando associado ao calor e a desidratação (OHTSUKA et al., 1994; LAITANO et al., 2010; HILLMAN et al., 2011; LAITANO et al., 2012). Ohtsuka et al. (1994), em um dos primeiros estudos em humanos a avaliar os danos induzidos por ERO durante exposição passiva ao calor, observaram que a imersão em água a uma temperatura de 42°C por 10 minutos resultou em diminuição significativa da glutathiona (GSH) e um aumento dos peróxidos de lipídios circulantes. Por outro lado, a imersão em água a 25°C resultou em aumento da GSH nos glóbulos vermelhos sem alteração nos marcadores de lipoperoxidação no sangue.

Entretanto, quando a exposição ao calor está associada ao exercício os resultados são distintos. Tem sido observado que o exercício físico possui papel compensatório aos danos oxidativos oriundos a formação de ERO durante a exposição ao calor (SUREDA et al., 2015). Laitano et al. (2010) avaliaram o efeito do exercício no calor e da exposição passiva ao calor sobre marcadores anti e pró-oxidantes. Os participantes foram submetidos a hipertermia por meio de uma roupa de perfusão (roupa com um sistema de tubos conectada a um circulador de água aquecida) e realizaram exercício de extensão de joelho a 50% da potência pico pré-estabelecida. Foram realizadas coletas de sangue pré e pós cada condição experimental. As condições experimentais do estudo foram: 1) repouso sem calor; 2) exercício sem calor; 3) repouso com calor; 4) exercício com calor. Foi considerada como temperatura alvo para determinar a hipertermia dos participantes a elevação da temperatura central em 1,2°C e a da pele de 6°C. Os autores observaram que na condição repouso com calor houve um aumento da GSSG no sangue enquanto a GSH não sofreu nenhuma alteração, diminuindo a razão GSH/GSSG um indicador de estresse oxidativo. No entanto, quando o calor foi associado ao exercício houve aumento da GSH e GSSG, o que não provocou qualquer alteração na relação GSH/GSSG. Esse resultado sugere que o

exercício tem papel importante como medida compensatória durante a exposição ao calor de exercícios de resistência de intensidade moderada mantendo o estado redox do sangue em equilíbrio.

Assim como o calor, o estado de desidratação resulta em modificações no metabolismo da GSH. Apesar da dificuldade de isolar os efeitos da desidratação sobre esse marcador sem haver influência principalmente do aumento da temperatura corporal central, alguns estudos demonstram esse comportamento da GSH em situações de desidratação. Verificou-se que em situações de desidratação houve aumento significativo da GSSG pós exercício (HILLMAN et al., 2011) bem como em maior liberação de GSH no sangue durante exercício (LAITANO et al., 2012).

Em relação ao metabolismo da glutathiona em situações de estresse fisiológico como a hipertermia e a desidratação responsáveis por induzir, por exemplo, o estresse oxidativo, ainda não está claro se outros tecidos possuem capacidade de contribuir na sua liberação. Sabe-se que as células hepáticas são responsáveis em maior parte pela sua liberação. No entanto, alguns estudos sugerem que o músculo esquelético também possa ser uma fonte de GSH em situações de estresse severo (VESKOUKIS et al., 2009; LAITANO et al., 2012), contribuindo dessa forma para reverter o quadro de desequilíbrio do estado redox.

A ideia de o músculo esquelético possuir papel importante diante de situações de estresse vem sendo discutida fortemente nos últimos anos. Existem evidências que o músculo esquelético desempenha função endócrina mediante mecanismos estressores para o organismo que pode contribuir para garantir a homeostase sistêmica. (WELC; CLANTON et al., 2013). Essa capacidade endócrina dos músculos está relacionada as respostas ao exercício e desafios metabólicos produzindo e secretando citocinas (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012). Essas citocinas foram nomeadas de miocinas e definidas como, “citocinas ou outros peptídeos que são produzidos e liberados por fibras musculares com efeitos parácrinos, autócrinos ou endócrinos” (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012). Portanto, é válida a hipótese de o músculo esquelético contribuir na liberação da GSH em situações de estresse fisiológico como, por exemplo, durante hipertermia e desidratação.

1.2.4 Exercício físico no calor, desidratação e estresse oxidativo

O exercício físico está relacionado à produção de EROs, uma vez que o músculo esquelético ativo durante a prática de exercício é uma das principais fontes de produção dessas espécies reativas (REID et al., 1992a, 1992b). Embora o exercício físico induza a formação de EROs, ainda não está claro a funcionalidade dessa indução. Enquanto exercícios que exigem maior atividade muscular produzem quantidades elevadas de EROs, capazes de danificar células, exercícios físicos leves a moderados são capazes por meio da produção elevada de EROs de promover efeitos reguladores importantes nas respostas oxidantes. Além disso, outros fatores podem contribuir e acentuar a formação de EROs. Por exemplo, a hipertermia e a desidratação são fatores que, associados ou não ao exercício, podem induzir a formação de ERO e promover um desequilíbrio no estado redox.

1.2.5 Exercício físico no calor e estresse oxidativo

A prática de exercício físico no calor é considerada um desafio a homeostase corporal. A temperatura ambiente elevada, bem como uma umidade relativa do ar desfavorável, implica em um importante estresse térmico fisiológico (MAUGHAN; OTANI; WATSON, 2012). Um dos desafios fisiológicos durante a exposição ao estresse térmico são as respostas oxidantes durante essa exposição. Nos últimos anos, estudos têm investigado os efeitos da prática de exercício em ambiente quente relacionado as repostas pró e antioxidantes (HILLMAN et al., 2011; LAITANO et al., 2012). Dentre as áreas de investigação, tem sido avaliada as respostas do músculo esquelético como fonte da produção de ERO durante a exposição ao calor, de forma ativa e/ou passiva. A temperatura do músculo ativo durante exercício com duração de 30 – 90 minutos, a aproximadamente 75% do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), pode ser maior que a temperatura corporal central em $0,7-1^{\circ}C$ (PARKIN et al., 1999). Além disso, durante exercício prolongado (> 60 min) no calor, com intensidade superior a 70% VO_{2max} , a temperatura do músculo pode ultrapassar $41^{\circ}C$. Até mesmo, a exposição do músculo esquelético de maneira passiva ao calor pode estimular a produção de ERO (ZUO et al., 2004).

As fontes de produção de ERO induzida pela exposição ao calor ainda não estão claras, principalmente em humanos. Tem sido proposto que fontes mitocondriais e não mitocondriais estão associadas a formação de ERO (KING et al., 2016). A ativação de fosfolipases, por exemplo, tem sido suportada de maneira geral como outra via de formação de ERO no músculo esquelético (NETHERY et al., 1999). Em experimentos *in vitro* durante a exposição ao calor as fosfolipases (da classe A2) têm provocado a liberação de ácido araquidônico e outros metabólitos (CALDERWOOD et al., 1989). Por outro lado, quando a ativação das fosfolipases é bloqueada há uma supressão na formação de ERO no músculo esquelético durante exposição ao calor (ZUO et al., 2004). Desse modo, está evidenciado que a produção de ácido araquidônico a partir da ação da fosfolipase, serve como substrato para outros produtos que estimulam ou inibem a produção de ERO, especialmente o radical $O_2^{\cdot-}$ (ZUO et al., 2004).

Durante a hipertermia o músculo esquelético não é especificamente o único meio de formação de ERO. Células do sistema imunológico apresentam papel importante no balanço oxidativo durante a exposição ao calor (32°C, 75% de umidade relativa do ar) durante o exercício (quando se observam temperaturas corporais centrais > 39°C), principalmente relacionado ao dano proteico em linfócitos e neutrófilos (SUREDA et al., 2009), diferentemente quando o exercício é praticado em ambiente frio (10°C, 45% de umidade relativa do ar) (MESTRE-ALFARO et al., 2012). Além do sistema imunológico, outra potencial via de fonte de ERO é a redução de fluxo sanguíneo observada em órgãos. Há evidências que a exposição ao calor passivo promove danos de tecidos em modelo animal, e que não apenas a exposição crônica ao calor como a passiva também é capaz de gerar danos teciduais (OLIVER et al., 2012). O mecanismo de isquemia/reperfusão observada nessas situações é o principal responsável pelos danos relatados. Mediante um aumento passivo da temperatura central de 41,5°C observou-se uma redução do fluxo sanguíneo esplâncnico de 40%, levando ao aumento de mediadores de danos teciduais (HALL et al., 2001), demonstrando que a redução de fluxo sanguíneo de órgãos é um potencial mecanismo formador de ERO.

Estudos em humanos têm demonstrados resultados similares aos observados em modelos animais em relação ao aumento de marcadores de estresse oxidativo durante exposição ao calor. Mestre-Alfaro et al. (2012) e

Sureda et al. (2015) realizaram em seus estudos um mesmo protocolo. Em ambos os estudos, os indivíduos exercitavam durante 45 minutos a uma intensidade de 75-80% do VO_2max sendo expostos a duas condições ambientais: calor, a uma temperatura de 30-32°C e umidade relativa do ar 75-78%; e uma condição fria com temperatura 10-12°C e umidade 40-55%. Observou-se que tanto os marcadores circulatórios de dano oxidativo como a atividade de enzimas antioxidantes foram significativamente aumentados após o exercício no calor.

Quindry et al. (2013) também avaliaram os efeitos da temperatura ambiental sobre marcadores de estresse oxidativo durante o exercício. Nesse estudo os participantes realizaram exercício a uma intensidade moderada (60% da potência máxima) durante 60 minutos em três diferentes temperaturas, 7, 20 e 33°C. O exercício e a recuperação em um ambiente quente levaram a maiores respostas de estresse oxidativo em comparação com o exercício e a recuperação em ambientes mais frios. Desse modo, as respostas oxidativas parecem estar mais associadas à indução de hipertermia induzida pela exposição ao calor do que ao próprio exercício. Além disso, há evidências que o exercício é responsável por contrapor o dano oxidativo aumentando a capacidade antioxidante do sangue, agindo com função protetora (LAITANO et al., 2010).

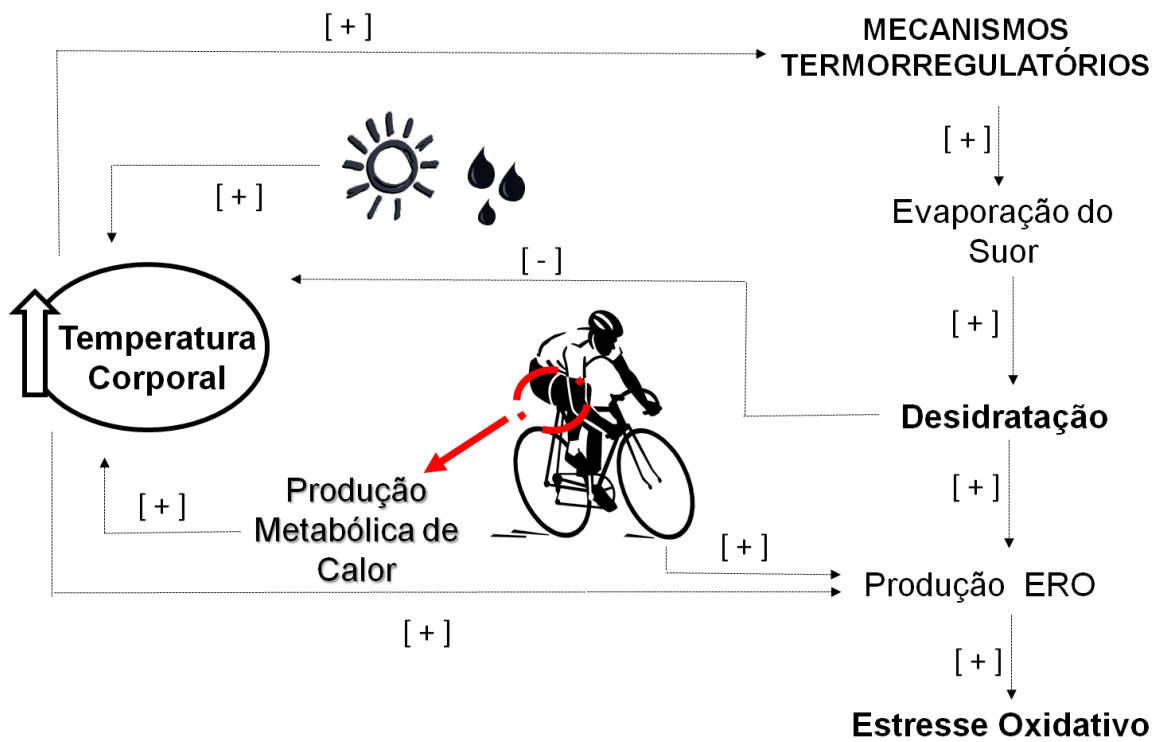
1.2.6 Desidratação e estresse oxidativo

Os efeitos da desidratação são constantemente descritos como fator limitante no desempenho, principalmente, durante o exercício de resistência. Um dos mecanismos potencialmente relacionados à redução do desempenho é o desequilíbrio no estado redox ocasionado pela desidratação. Poucos estudos em humanos até o momento investigaram de maneira isolada (sem o fator estresse térmico, ou seja, desidratação não induzida por exposição ao calor) a influência da desidratação no estresse oxidativo. Esses estudos demonstram que a desidratação implica negativamente no equilíbrio redox. Hillman et al. (2011) investigaram os efeitos da desidratação induzida por exercício, com e sem hipertermia, no estresse oxidativo. Foi observado que uma desidratação

de aproximadamente 3,8% aumentou significativamente os valores de GSSG enquanto o estado de euhidratação atenuou esse aumento.

Em um estudo seguinte, Hillman et al. (2013) observaram que a reposição hídrica minimiza o estresse oxidativo associada ao exercício, embora não influencie na termorregulação e no desempenho. Além do estudo de Hillman et al. (2013), outros estudos também demonstraram que reidratação após um período de desidratação e em diferentes percentuais de desidratação possui efeito protetor sobre os danos associados ao estresse oxidativo (PAIK et al., 2009; LAITANO et al., 2012). A principal explicação para esse efeito protetor ocasionado pela reidratação seria o fato de conseguir reverter o quadro de hemoconcentração, consequência da desidratação, e assim minimizar o estresse por cisalhamento. Com o efeito de cisalhamento na parede do vaso ocorre uma série de sinalizações que promovem a liberação de óxido nítrico (CONNES et al., 2013) e a liberação de EROs da parede do vaso (LEHOUX, 2006). Além de induzir a formação de EROs, o estresse por cisalhamento é considerado um fator físico importante para a hemólise que pode induzir à formação de EROs por outras vias de sinalização (LEVERETT et al., 1972). Portanto, a hemoconcentração decorrente da desidratação pode explicar a formação de ERO associada ao exercício.

Figura 1. Efeitos da hipertermia e da desidratação sobre o estresse oxidativo.



Legenda: ☀️ Exposição ao calor - 💧 Umidade relativa do ar - [+] estimula a resposta - [-] inibe a resposta

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 PROBLEMA DE PESQUISA

Quais as alterações dos níveis circulatórios de glutathiona reduzida e oxidada em homens fisicamente ativos durante o exercício no calor com e sem desidratação?

Os eritrócitos contribuem na liberação da glutathiona reduzida em resposta a exposição ao calor?

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Determinar os níveis circulatórios de glutathiona reduzida e oxidada durante o exercício no calor com e sem desidratação em homens fisicamente ativos, bem como, a contribuição dos eritrócitos (de homens fisicamente ativos) na liberação da glutathiona reduzida em resposta à exposição ao calor.

2.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos serão descritos a seguir separadamente, de acordo com cada experimento (em humanos e *in vitro*):

- Determinar as concentrações de glutathiona reduzida e oxidada no sangue em homens fisicamente ativos durante o exercício no calor (38°C e 50% URA) e em condição termoneutra (25°C e 50% URA), com e sem desidratação.

- Descrever os efeitos da exposição de eritrócitos as temperaturas (35° e 41°C) sobre a liberação de glutathiona reduzida.

2.3 HIPÓTESES

As hipóteses serão descritas a seguir separadamente, de acordo com cada experimento (em humanos e *in vitro*):

Experimento em humanos:

H1 - Os níveis circulatórios de glutathiona reduzida e oxidada em homens fisicamente ativos será maior durante o exercício no calor com desidratação comparado a situação sem desidratação.

H2 – Os níveis circulatórios de glutathiona reduzida e oxidada em homens fisicamente ativos será maior durante o exercício em ambiente termoneutro com desidratação comparado a situação sem desidratação.

Experimento *in vitro*:

H1 – Os eritrócitos contribuem na liberação de glutathiona reduzida durante a exposição ao calor.

3 CAPÍTULO II: REVISÃO SISTEMÁTICA

“EXERCISE, HEAT AND OSMOTIC STRESS: A SYSTEMATIC REVIEW WITH INSIGHTS FOR REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ANTIOXIDANT DEFENSE”

Denise de Melo-Marins ¹

Juliano Boufleur Farinha ¹

Josianne Rodrigues-Krause¹

Orlando Laitano ²

Alvaro Reischak-Oliveira¹

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS

2 Universidade da Flórida, Gainesville, FL

ABSTRACT

Background: Heat and dehydration associated with exercise promote changes in pro and antioxidant markers. In this sense, we conducted a systematic review that aimed to verify the pro and antioxidant responses during exercise associated with hyperthermia and dehydration. *Methods:* We searched MEDLINE, Cochrane Wiley, Clinical Trials.gov, PEDRO and LILACS. We included clinical trials that investigated healthy young individuals on the pro and antioxidant responses of exercise associated with heat (hyperthermia) and / or exercise associated with dehydration. Two independent reviewers extracted data and assessed the quality of the included studies. *Results:* A total of 1,014 records were selected, nine full papers were evaluated for eligibility, and eight papers met the inclusion criteria. Studies investigating the effects of exercise associated with hyperthermia indicate that exercise in heat may promote adaptations in antioxidant defense, reducing the negative effects of isolated heat on the oxidative response. On the other hand, studies show that exercise-induced dehydration increases pro-oxidant markers and is attenuated by rehydration. *Conclusion:* Exercise may attenuate oxidative damage caused by hyperthermia, however, when dehydration is present, regardless of exercise, an enhanced pro-oxidant response is observed.

Keywords: oxidative stress, hyperthermia, hydration, exercise

3.1 Introduction

Free radicals are atoms or molecules that possess unpaired electrons in its orbital, making them highly reactive and susceptible to interact and modify other molecules and change the cellular redox balance (POWERS; JACKSON, 2008; FINAUD et al., 2006). Despite not possessing unpaired electrons, reactive oxygen species (ROS) are naturally produced by the cell oxidative metabolism (BENTLEY et al., 2014) and are also highly reactive. ROS formation is associated with alterations in the cell structure and function (POWERS; JACKSON, 2008). For example, an excessive production of ROS is linked to negative alterations in different cell components, such as lipids, deoxyribonucleic acid (DNA) and proteins (POWERS et al., 2004), which may be related with the development of several disorders, such as cancer (SOUTHRN; POWIS, 1988; GOLDEN et al., 2002), Parkinson's disease (GOLDEN et al., 2002), and diaphragm dysfunction associated with heart failure (LAITANO et al., 2016), among many others. In addition, excessive production of ROS may lead to locomotor and respiratory muscle fatigue (REID et al., 1992a, 1992b), once redox imbalance is associated with damage to skeletal muscle. On the other hand, the formation of low levels of ROS contribute to cell adaptation induced by exercise, such as the expression of an oxidative phenotype in the skeletal muscle (POWERS et al., 2011; RISTOW et al., 2009). Moreover, the formation of ROS in optimal levels is essential for controlling the cell volume in conditions of hyperthermia (KING; CLANTON; LAITANO, 2016), necessary for maintaining the cell functioning.

It is widely accepted that acute physical exercise disrupts the cellular and circulatory redox balance (SOUZA-SILVA et al 2016; PARK; KWAK, 2016), because the active skeletal muscle is a major source of ROS and heat production (DAVIES et al., 1982; BAILEY et al., 2004). In parallel to that, hyperthermia and sweat-induced dehydration have been linked with the production of ROS at intramyocellular level (ZUO et al., 2004; OLIVER et al., 2008) and into the circulation (LAITANO et al., 2010; HILLMAN et al., 2011; HILLMAN et al., 2013; QUINDRY et al., 2013; LAITANO et al. 2012; KING; CLANTON; LAITANO, 2016), under independent or combined pathways.

Distinct responses are observed when hyperthermia and dehydration are associated with exercise, even though both are associated with oxidative stress (OS). For instance, Laitano et al. (2010) determined the combined and separated effects of exercise and thermal stress on redox status. The OS was induced by isolating the thermal stress, with no exercise. Conversely, when exercise was combined to thermal stress, there was a higher response of the antioxidant system, maintaining the redox balance (LAITANO et al., 2010). Other studies have shown that exercise-induced dehydration increases ROS production, however, it did not induce the antioxidant responses that followed the combination of exercise and hyperthermia (LAITANO et al. 2012; KING; CLANTON; LAITANO, 2016). From these studies, it is logical to conclude that hyperthermia per se induces circulatory redox imbalance and when exercise is superimposed this imbalance is offset by an increased antioxidant defense. The source of oxidants promoting these changes in the circulation are unclear. It is possible that heat per se is inducing blood oxidative stress by acting upon catecholamine.

The hyperthermia associated with dehydration may reduce the performance of endurance athletes. Exercise-induced dehydration (acute reduction greater than 2% of body mass) promotes a significant reduction in exercise performance. In addition to affecting performance, the association between exercise in the heat and dehydration contributes to an increase in ROS, which may negatively affect health (WENDT; VAN LOON; LICHTENBELT, 2007). The excessive production of ROS associated with hyperthermia and/or dehydration may lead to increased inflammatory signaling and increased susceptibility to the development of injuries. Hall et al. (2001) demonstrated in rats that passive elevation of body temperature (41.5°C) significantly reduced splanchnic blood flow and that this reduction promoted circulatory increase of prooxidant markers. Oliver et al. (2012) presented similar results, demonstrating that hyperthermia damaged the intestinal lining in rodents, which can be attributed to ROS. These findings suggest that reduction of splanchnic blood flow due to redistribution of cardiac output and increase to the skin (thermoregulatory mechanism) in the presence of heat stress may result in the production of ROS.

As described above, the literature about heat and osmotic stress leading to changes on the redox status during exercise in hot environments is abundant and, to the best of our knowledge, no study has investigated the pro- and antioxidant responses of hyperthermia and dehydration associated with exercise through a systematic review yet. Therefore, our aim was to conduct a systematic review of the literature on pro- and antioxidant response of the exercise associated to hyperthermia and dehydration. Our approach is to evaluate the methodological quality of selected articles through a systematic searching and to investigate the responses of pro- and antioxidant circulatory markers in a quantitative manner.

3.1 Methods

3.1.1 Search strategy and study selection

The following electronic databases were searched for articles published until May 2017: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online MEDLINE (accessed by Pubmed), Cochrane Wiley (Central Register of Controlled Trials), Clinical Trials.gov, Physiotherapy Evidence Database (PEDRO), and “Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde” (LILACS). In addition, the reference lists of relevant published studies were searched manually. To identify relevant publications, the combined search term (exploded versions of the Medical Subject Headings [MeSH]) were used: (Men OR Man OR Adults OR Middle Aged Man OR Athletes OR Human) AND (Exercise OR Physical Activity OR Exercise Induced OR Exercise Training) AND (Heat Exhaustion OR Hot Temperature OR Extreme Heat OR Induced Hyperthermia OR Thermoregulation OR Warm Environment OR Heat Stress) AND (Dehydration OR Water Stress OR Water-Electrolyte Imbalance OR Fluid Balance). Studies were reported in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews (PRISMA) (MOHER et al., 2009).

3.1.2 Eligibility criteria

We included clinical trials investigating healthy subjects, aged between 20 and 40 years, on pro- and antioxidant responses of the exercise associated with heat (hyperthermia) and/or exercise associated with dehydration. Studies investigating subjects with cardiovascular disease, metabolic or thermal disorders were excluded of this review.

3.1.3 Data extraction

Titles and abstracts of retrieved articles were independently evaluated by two investigators. Abstracts that did not provide enough information about the inclusion and exclusion criteria were submitted to full evaluation. Two reviewers independently evaluated full text articles, determined study eligibility, and conducted data extraction. Disagreements were solved by consensus or by a third reviewer. Specific characteristics of the study design and experimental protocol (exercise volume and intensity, description of induced-hyperthermia), age and gender of participants, specific outcomes and methods of assessments were detailed described.

3.2 Results

3.2.1 Study selection process

From 1,054 potentially relevant citations identified through electronic database searching, plus searches of reference lists (five citations), 1,014 records were screened (after removing duplicates) and nine full text articles were assessed for eligibility. After that, one article was excluded due the type of intervention (hyperhydration was induced in the protocol (HILLMAN et al., 2013). Thus, eight studies were included in the systematic review, (the study by Hillman et al., 2011 was included in the two approaches of the present systematic review, totalizing the following nine studies) including seven studies approaching exercise associated with hyperthermia (with euhydrated participants), and two studies approaching exercise associated with dehydration

(without heat stress). All studies evaluated oxidative stress parameters in humans. Figure 1 shows a flow diagram of search and selection of studies.

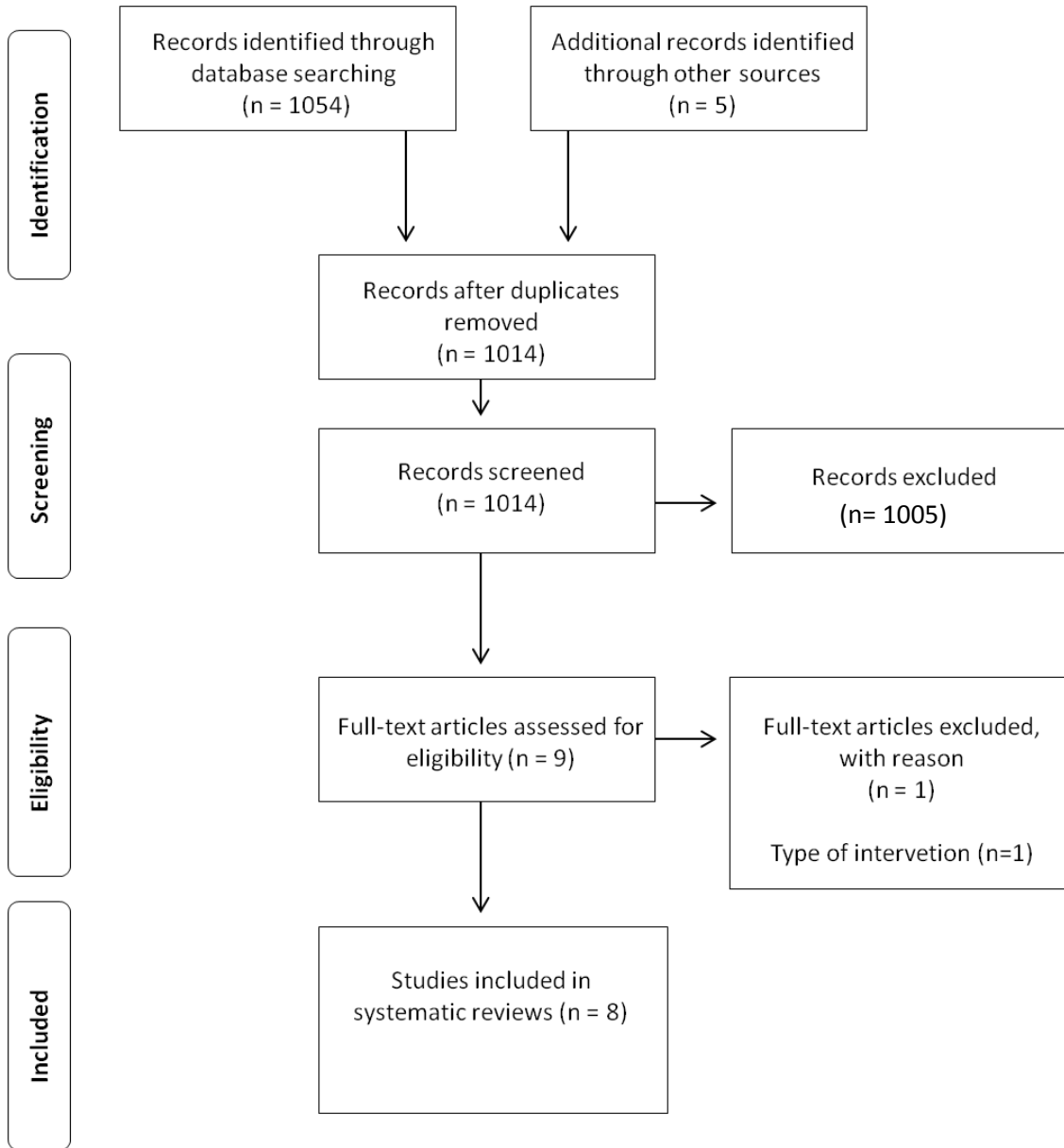


Figure 1. Flow diagram of search and selection of studies.

3.2.2 Characteristic of participants

The studies included a total of 68 participants, in a range of age between 19.5 and 36 years. All included studies evaluated men, most of them investigating endurance athletes (HILLMAN et al., 2011; MESTRE-ALFARO et al., 2012; PILCH et al., 2014; SUREDA et al., 2015). Although there was no restriction for sex in the search and selection of studies process in this review, no studies were found evaluating the responses of the exercise associated to hyperthermia or dehydration in women. Please, see table 1.

3.2.3 Characteristics of interventions

Most of the studies reported the intensity of the exercise sessions varying between 50% and 95% of the maximum oxygen consumption (VO_{2max}). Exercise intensities were usually determined by incremental maximum effort test protocols, by the analysis of subjects' lactate thresholds and/or VO_{2max} and/or maximum load.

The procedures used to induce hyperthermia were performed by practicing exercise in environmental chambers or heated rooms, with temperatures varying from 32 to 35°C, and relative humidity from 40 to 70%. Dehydration was commonly induced by privation of liquid intake, or by the exercise practicing in heated environment.

The description the type of exercise, volume and intensity used in each study, as well as the protocols for inducing hyperthermia are detailed described in tables 1 and 2.

3.2.4 Hyperthermia and exercise: Pro- and antioxidant responses in humans

Seven (MCANULTY et al., 2005; LAITANO et al., 2010; HILLMAN et al., 2011; MESTRE-ALFARO et al., 2012; PILCH et al., 2014; QUINDRY et al., 2013; SUREDA et al., 2015) out of the eight selected studies evaluated pro- and antioxidant responses during exercise associated to hyperthermia (table 1). In general, studies indicate that exercise may promote positive adaptations on

antioxidant responses, attenuating the deleterious effects of isolated hyperthermia on antioxidant pattern (LAITANO et al., 2010; QUINDRY et al., 2013; PILCH et al., 2014; SUREDA et al., 2015).

3.2.5 Dehydration and exercise: Pro- and antioxidant responses in humans

Two studies evaluated the effects of dehydration associated with exercise on pro- and antioxidant responses (HILLMAN et al., 2011; LAITANO et al., 2012). Results demonstrated that exercise-induced dehydration increased pro-oxidant markers, concomitant to a trend to reduce antioxidant responses (table 2).

3.3.6 Study quality assessment

Study quality was assessed using Physiotherapy Evidence Database (PEDro) scale, an 11-item instrument designed to assess the methodological quality of randomized and non-randomized controlled trials. The maximum score is 10 points, including the random sequence generation and allocation, baseline comparisons, adequate statistical analysis, experimental conditions concealment, etc. From the eight studies included in this review, four attained 6 points, it means, satisfactory methodological quality (HILLMAN et al., 2011; MESTRE-ALFARO et al., 2012; QUINDRY et al., 2013; SUREDA et al., 2015), and four attained 5 points. Studies were more successful in describing the items 4, 8, 9, 10 e 11 (which refer to: the similarity of the subjects evaluated before the start of the interventions (item 4), the measurements of at least one key result obtained in more than 85% of the subjects initially distributed by the groups (item 8), all subjects receiving the same interventions proposed (item 9), the results of the statistical comparisons intergroups described for at least one key outcome (item 10), and the studies presented both precision measures and measures of variability for at least one key outcome (item 11). The major weakness among studies was related to the items 3, 5, 6 e 7 (regarding subjects' allocation having been secreted (item 3), all subjects blindly participated in the study (item 5), the researchers were blinded to the study

conditions (item 6), and all the evaluators who measured at least one key outcome did blindly (item 7).

Table 1. Studies that evaluated the effects of exercise associated with hyperthermia on oxidative stress parameters in euhydrated humans.

| Study | Subjects characteristics | Exercise protocol | | | Markers of OS measured (outcome) | |
|-----------------------------------|--|--|-----------|---------------------------|---|--|
| | | Description, hyperthermia | Duration | Intensity | Pro-oxidant | Antioxidant |
| Laitano et al., 2010 | 8, males, recreationally active, 26±2 | One legged knee-extensor ergometer, 1°C increase rectal temperature and 6°C skin temperature | 6 min | 50% Wmax | GSSG (↑62.5%)* Iso (↑16.7%) | GSH (↑30.7%)* SOD (↓13.6%)* |
| Hillman et al., 2011 | 7, males, cyclists, 36±6 | Cycle ergometer, 38.8 °C rectal temperature | 90 min | 95% LT | GSSG (↔) TBARS (↑11.2%) | tGSH (↑0.2%) |
| Sureda et al., 2015 | 9, males, endurance-trained athletes, 35±1.9 | Treadmill, 39.8°C rectal temperature | 40 min | 75–80% VO _{2max} | MDA (↑22.6%) 8-OHdG (↑11.4%) CARB (↑13.4%) | CAT (↑37.2%)* SOD (↑7.6%) PON1 (↑3.5%) |
| Quindry et al., 2013 | 12, males, recreationally active, 27.1±5 | Cycle ergometer, 39.2°C rectal temperature | 60 min | 60% Wmax | LOOH (↑26.89%) CARB (↑27.28%) | FRAP (↑15.39%)* TEAC (↑11.61%)* |
| McAnulty et al., 2005 | 6, males, recreationally active, 26±2.8 | Treadmill, 39.5°C rectal temperature | ±49.8 min | 50% VO _{2max} | Iso (↑46.29%)* LPO (↑45.2%)* | Not Evaluated |
| Pilch et al., 2014 | 10, males, endurance-trained athletes, 22±0.5 | Cycle ergometer, 1.2°C increase in rectal temperature | 31 min | 53% VO _{2max} | Peroxidation status (↑47.1%)* | Antioxidant status (↑21.4%)* |
| Mestre-Alfaro et al., 2012 | 9, males, athletes (endurance-trained, marathoners, triathletes and Ironman), 35±1.9 | Treadmill, 39.4°C rectal temperature and 36.9°C skin temperature | 45 min | 75–80% VO _{2max} | Lymphocytes: MDA (↓12.9%) CARB (↑53.9%)* Neutrophils: MDA (↑19.4%) CARB (↑16.4%) | Lymphocytes: CAT (↓5.96%) GPx (↑4.6%) GR (↑10.34%) |

SOD (↑6.5%)
 Neutrophil:
 CAT (↓0.4%)
 GPx
 (↓21.9%)*
 GR (↓7.5%)
 SOD (↓6.8%)

Wmax: maximum load; VO_{2max}: maximum oxygen consumption; LT: lactate threshold; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; SOD: superoxide dismutase; Iso: isoprostanes; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehyde; CARB: protein carbonyls; CAT: catalase; PON1: paraoxonase-1 activity; 8-OHdG: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine; LOOH: lipid hydroperoxide; TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity; FRAP: ferric reducing antioxidant potential; LPO: lipid hydroperoxides; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase. * p<0,05

Table 2. Studies that evaluated the effects of exercise associated with dehydration on oxidative stress parameters.

| Study | Subjects characteristics | Exercise protocol | | | Markers of OS measured (outcome) | |
|-----------------------------|---|---|----------|-----------|---|--|
| | | Description, hyperthermia | Duration | Intensity | Pro-oxidant | Antioxidant |
| Laitano et al., 2012 | 7, males, recreationally active, 19.5±0.2 | One legged knee-extensor ergometer; Mild dehydration: 37.7°C rectal temperature and 34.8°C skin temperature Moderate dehydration: 37.8°C rectal temperature and 35.5°C skin temperature | 5 min | 50% Wmax | Mild dehydration: GSSG (↑4.1%); Iso (↑3.6%); Moderate dehydration: GSSG (↑3.2%); Iso (↑3.1%); | Mild dehydration: GSH (↑12.8%) SOD (↓4.9%) Moderate dehydration: GSH (↑13.4%) SOD (↑1.7%) |

| | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|---|--------|--------|-------------------------------------|-----------------|
| Hillman et al., 2011 | 7, males, cyclists, 36±6 | Cycle ergometer, 38.8 °C rectal temperature | 90 min | 95% LT | GSSG (↑20.4%)* TBARS (↑33.9%) | tGSH (↑5.2%) |
|-----------------------------|-----------------------------|---|--------|--------|-------------------------------------|-----------------|

Wmax: maximum load; LT: lactate threshold; GSH: glutathione; GSSG: glutathione disulfide; SOD: superoxide dismutase; Iso: isoprostanes; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances. * p<0,05

3.4 Discussion

This systematic review aimed to verify the pro- and antioxidant responses regarding exercise-induced hyperthermia and/or dehydration in physically active or athletes healthy adults. Moreover, we seek to explore some mechanisms associated with pro- and antioxidant responses on these conditions. To the best of our knowledge, this is the first systematic review that addresses this topic.

Few studies were found concerning hyperthermia and dehydration on oxidative stress responses in humans, of which mostly restrict the population on young men, physically active or endurance athletes. Most studies determined exercise intensity based on maximal oxygen uptake (MCANULTY et al., 2005; MESTRE-ALFARO et al., 2012; PILCH et al., 2014; SUREDA et al., 2015). The induction of hyperthermia was mostly performed through exercise performance on warm environment (HILLMAN et al., 2011; MCANULTY et al., 2005; MESTRE-ALFARO et al., 2012; PILCH et al., 2014; QUINDRY et al., 2013; SUREDA et al., 2015) or water-perfused suit (LAITANO et al., 2010, 2012). Of note, the dehydration was mainly induced by the restriction of fluid ingestion before experimental bouts (HILLMAN et al., 2011), or by the exercise performance on warm environment without water ingestion (LAITANO et al., 2012).

The results of the studies included in this review show that hyperthermia when combined with moderate-intensity exercise attenuated the increases pro-oxidant responses due to increased antioxidant defenses (LAITANO et al., 2010). On the other hand, the dehydration during exercise led to increased significant only pro-oxidative responses, leading the oxidative stress (LAITANO

et al 2012; HILLMAN et al 2013). In this regard, exercise may attenuate oxidative damage caused by thermal stress, however, when dehydration is present, independently of exercise, an increased pro-oxidant response is observed.

The heat stress is associated with increased ROS production at skeletal muscle (ZUO et al., 2000), which is attenuated when the increasing of body temperature is controlled (HILLMAN et al., 2011; KING; CLANTON; LAITANO, 2016; LAITANO et al., 2010; QUINDRY et al., 2013). However, the effects of hyperthermia on ROS production sources are still poorly understood. It is argued that increase may be a result of skeletal muscle compensations promoted by the effects of osmotic stress (KING; CLANTON; LAITANO, 2016).

Furthermore, the contributions of skeletal muscle, other mechanisms are mentioned for they promote ROS formation during hyperthermia. Among the mechanisms cited in the studies selected for stimulating the increase of ROS formation by the increase core temperature, include the increase cytotoxicity of iron and the production of nitric oxide via uncoupling the mitochondrial respiratory chain (FREEMAN; SPITZ; MEREDITH, 1990; HALL et al., 1994). There is also evidence of increased enzyme xanthine oxidase activity, which results in increased depletion of cellular glutathione, a marker widely used to assess oxidative damage (DI MEO; VENDITTI, 2001; HALL et al., 1994, 2001).

In addition to the before mentioned mechanisms, the increase in ROS production by the increase core temperature is also explained by the rise degradation of muscle glycogen (HARGREAVES; FEBBRAIO, 1998). With increased muscle glycogenolysis observed in hyperthermia, there is a greater accumulation of blood lactate (SUREDA et al., 2015). This accumulation may trigger increased ROS, such as the superoxide radical, due to the activation of NADH oxidase (MOHAZZAB; KAMINSKI; WOLIN, 1997), or to affect pH homeostasis and promote the formation of a xanthine oxidase isoform, resulting also in the formation of superoxide (SJODIN; WESTING-HELLSTEN; APPLE et al., 1990; FEBBRAIO, 2000). Furthermore, the autoxidation of catecholamine, which are released in greater amounts during exercise-associated hyperthermia, may also justify increased ROS formation (GONZALEZ-ALONSO; CALBET, 2003; SUPINSKI et al., 1996).

As with hyperthermia, was observed through the articles selected that dehydration also promotes increase ROS production. The redox state imbalance induced by dehydration is cited, for example, as one of the mechanisms potentially related to impair exercise capacity. As observed in this review, few studies in human (only two according to our research) to date has investigated the influence of isolated dehydration on oxidative stress (without the thermal stress, i.e. dehydration associated with exercise in the heat). Dehydration levels higher than 3% have been shown to increase the pro-oxidative responses, whereas the euhydration state attenuates this increase associated with the exercise (HILLMAN et al., 2013; PAIK et al., 2009; LAITANO et al., 2012).

The main mechanism that explains this protective effect caused by the rehydration would be the fact of being able to revert the hemoconcentration because of the dehydration, and thus minimize the shear stress. The effect of shear stress on the vascular wall promote a chain of signaling releasing of nitric oxide (as discussed previously, nitric oxide contributes to the formation of ROS also with heat stress) (CONNES et al., 2013) and the release of ROS from vascular wall (LEHOUX, 2006). Further to inducing the formation of ROS, shear stress is considered an important physical factor for hemolysis that may induce the formation of ROS by other signaling pathways (LEVERETT et al., 1972). Therefore, hemoconcentration due to dehydration may also explain the formation of ROS during exercise.

From these findings, is possible to better understand the pro and antioxidant responses of the exercise associated with hyperthermia and dehydration. However, still necessary to clarify some aspects related to the formation of ROS in the scope of performance and health when associated with hyperthermia and dehydration. The number of studies selected, the variety of evaluation methods, especially about the type of exercise, intensity and duration, as well as the restricted population evaluated, limit a greater understanding about the subject, these being the limitations of this review systematic.

It is important to emphasize that the aim of this review was to evaluate the oxidative stress responses in humans during exercise associated with hyperthermia and dehydration. Despite the small number of selected studies, to

our knowledge, these studies are those that the literature makes available within the selected inclusion criteria. Thus, further studies are required, including different populations (e.g. women, patients with chronic diseases), different types of exercise, different durations and intensities, different levels of hydration at different times (pre, post and recovery). This will allow to better understand the subject, both in health and performance.

3.5 Conclusions

Hyperthermia *per se* shifts the redox balance towards pro-oxidant responses. When combined with moderate-intensity exercise, this effect is attenuated due to increases in endogenous antioxidant defense pathways. Dehydration during exercise may lead to increased oxidative stress, which can be partially restored with rehydration. In this respect, exercise may attenuate oxidative damage caused by thermal stress, however, when dehydration is present, regardless of exercise, an enhanced pro-oxidant response is observed, which is minimized only by rehydration. Although this review elucidates some pro and antioxidant responses during exercise associated with hyperthermia and dehydration, the small number of studies indicates that more research should be done to better clarify the behavior of these responses in the context of thermoregulation and water balance.

References

1. POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.
2. FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress. *Sports medicine*, v. 36, n. 4, p. 327-358, 2006.
3. BENTLEY, D. J. et al. Acute and Chronic Effects of Antioxidant Supplementation on Exercise Performance. *Antioxidants in Sport Nutrition*, p. 141, 2014.
4. POWERS, S. K. et al. Dietary antioxidants and exercise. *Journal of sports sciences*, v. 22, n. 1, p. 81-94, 2004.
5. SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 1988. p. 390-408.
6. GOLDEN, T. R.; HINERFELD, D. A.; MELOV, S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging cell*, v. 1, n. 2, p. 117-123, 2002.
7. LAITANO, O. et al. Pharmacological targeting of mitochondrial reactive oxygen species counteracts diaphragm weakness in chronic heart failure. *Journal of Applied Physiology*, v. 120, n. 7, p. 733-742, 2016.
8. REID, M. B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *Journal of Applied Physiology*, v. 73, n. 5, p. 1797-1804, 1992a.
9. REID, M. B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *Journal of Applied Physiology*, v. 73, n. 5, p. 1805-1809, 1992b.
10. POWERS, S. K.; TALBERT, E. E.; ADHIHETTY, P. J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, v. 589, n. 9, p. 2129-2138, 2011.
11. RISTOW, M. et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 21, p. 8665-8670, 2009.
12. KING, M. A.; CLANTON, T. L.; LAITANO, O. Hyperthermia, dehydration, and osmotic stress: unconventional sources of exercise-induced reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 310, n. 2, p. R105-R114, 2016.
13. SOUZA-SILVA, A. A. et al. High intensity interval training in the heat enhances exercise-induced lipid peroxidation, but prevents protein oxidation in physically active men. *Temperature*, n. just-accepted, p. 00-00, 2015.

14. PARK, S.Y.; KWAK, Y. S. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. *Journal of exercise rehabilitation*, v. 12, n. 2, p. 113, 2016.
15. DAVIES, K. J. A. et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982.
16. BAILEY, D. M. et al. Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 287, n. 4, p. H1689-H1699, 2004.
17. ZUO, L. et al. Lipoygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, v. 97, n. 2, p. 661-668, 2004.
18. OLIVER, S. R. et al. Thermal tolerance of contractile function in oxidative skeletal muscle: no protection by antioxidants and reduced tolerance with eicosanoid enzyme inhibition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 295, n. 5, p. R1695-R1705, 2008. *Applied Physiology*, v. 120, n. 7, p. 733-742, 2016.
19. LAITANO, O. et al. Separate and combined effects of heat stress and exercise on circulatory markers of oxidative stress in euhydrated humans. *European journal of applied physiology*, v. 110, n. 5, p. 953-960, 2010.
20. HILLMAN, A. R. et al. Exercise-induced dehydration with and without environmental heat stress results in increased oxidative stress. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 36, n. 5, p. 698-706, 2011.
21. LAITANO, O. et al. Effects of graded exercise-induced dehydration and rehydration on circulatory markers of oxidative stress across the resting and exercising human leg. *European journal of applied physiology*, v. 112, n. 5, p. 1937-1944, 2012.
22. HILLMAN, A. R. et al. A comparison of hyperhydration versus ad libitum fluid intake strategies on measures of oxidative stress, thermoregulation, and performance. *Research in Sports Medicine*, v. 21, n. 4, p. 305-317, 2013.
23. QUINDRY, J. et al. Environmental temperature and exercise-induced blood oxidative stress. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, v. 23, n. 2, p. 128-136, 2013.
24. WENDT, D; VAN LOON, L. J. C; LICHTENBELT, W. D. Marken. Thermoregulation during exercise in the heat. *Sports medicine*, v. 37, n. 8, p. 669-682, 2007.
25. HALL, David M. et al. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 280, n. 2, p. H509-H521, 2001.

26. OLIVER, S. R. et al. Hyperthermia induces injury to the intestinal mucosa in the mouse: evidence for an oxidative stress mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 302, n. 7, p. R845-R853, 2012.
27. MOHER, D. et al. Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA statement reprint-Preferred reporting items for systematic. *Phys Ther*, v. 89, p. 873-880, 2009.
28. MESTRE-ALFARO, A. et al. Body temperature modulates the antioxidant and acute immune responses to exercise. *Free radical research*, v. 46, n. 6, p. 799-808, 2012.
29. PILCH, W. et al. Disturbances in pro-oxidant-antioxidant balance after passive body overheating and after exercise in elevated ambient temperatures in athletes and untrained men. *PloS one*, v. 9, n. 1, p. e85320, 2014.
30. SUREDA, A. et al. Exercise in a hot environment influences plasma anti-inflammatory and antioxidant status in well-trained athletes. *Journal of thermal biology*, v. 47, p. 91-98, 2015.
31. MCANULTY, S. R. et al. Hyperthermia increases exercise-induced oxidative stress. *International journal of sports medicine*, v. 26, n. 03, p. 188-192, 2005.
32. FREEMAN, Michael L.; SPITZ, Douglas R.; MEREDITH, Michael J. Does heat shock enhance oxidative stress? Studies with ferrous and ferric iron. *Radiation research*, v. 124, n. 3, p. 288-293, 1990.
33. HALL, DAVID M. et al. Hyperthermia stimulates nitric oxide formation: electron paramagnetic resonance detection of. NO-heme in blood. *Journal of Applied Physiology*, v. 77, n. 2, p. 548-553, 1994.
34. DI MEO, Sergio; VENDITTI, Paola. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Neurosignals*, v. 10, n. 1-2, p. 125-140, 2001.
35. HARGREAVES, Mark et al. Muscle metabolites and performance during high-intensity, intermittent exercise. *Journal of applied physiology*, v. 84, n. 5, p. 1687-1691, 1998.
36. MOHAZZAB-H, Kamal M.; KAMINSKI, Pawel M.; WOLIN, Michael S. Lactate and PO₂ modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase. *Circulation*, v. 96, n. 2, p. 614-620, 1997.
37. SJÖDIN, Bertil; WESTING, Ylva Hellsten; APPLE, Fred S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports medicine*, v. 10, n. 4, p. 236-254, 1990.
38. FEBBRAIO, Mark A. Does muscle function and metabolism affect exercise performance in the heat? *Exercise and sport sciences reviews*, v. 28, n. 4, p. 171-176, 2000.

39. GONZÁLEZ-ALONSO, José; CALBET, José AL. Reductions in systemic and skeletal muscle blood flow and oxygen delivery limit maximal aerobic capacity in humans. *Circulation*, v. 107, n. 6, p. 824-830, 2003.
40. SUPINSKI, G. et al. Glutathione metabolic responses to loaded breathing: variation among respiratory muscles. *Journal of Applied Physiology*, v. 81, n. 3, p. 1362-1369, 1996.
41. CONNES, P. et al. Exercise hemorheology: classical data, recent findings and unresolved issues. *Clinical hemorheology and microcirculation*, v. 53, n. 1-2, p. 187-199, 2013.
42. LEHOUX, S. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovascular research*, v. 71, n. 2, p. 269-279, 2006.
43. LEVERETT, L. B. et al. Red blood cell damage by shear stress. *Biophysical journal*, v. 12, n. 3, p. 257-273, 1972.

4 CAPÍTULO III: ARTIGO ORIGINAL

“DESEQUILÍBRIO REDOX INDUZIDO PELA DESIDRATAÇÃO DURANTE EXERCÍCIO NO CALOR “

RESUMO

O exercício, a hipertermia e a desidratação estão associados a presença de desequilíbrio redox. A glutathiona (GSH) é um importante marcador da defesa antioxidante, e sofre modificações nos seus níveis em resposta ao exercício associado a hipertermia e desidratação. No entanto, os mecanismos pelos quais ocorre aumento nos níveis circulatórios de GSH nessas condições ainda não são conhecidos. Os objetivos do presente estudo foram investigar os efeitos do exercício no calor com e sem desidratação (em humanos) e do estresse térmico isolado nos eritrócitos (in vitro) sobre o metabolismo da GSH. Dez homens fisicamente ativos realizaram exercício em quatro condições experimentais: termoneutro + euhidratação (T-EU); termoneutro + desidratação (T-DE); calor + euhidratação (C-EU); calor + desidratação (C-DE). As temperaturas das condições termoneutro e calor foram, respectivamente, de 23°C e 38°C. Os participantes realizaram exercício de intensidade moderada (60% $VO_{2\text{pico}}$) durante 60 minutos. A gravidade específica da urina foi analisada no início de cada visita. A frequência cardíaca e temperatura retal foram monitorados continuamente durante o exercício. Os registros da massa corporal para determinar o percentual de desidratação foram realizados pré e pós o exercício. Coletas de sangue foram realizadas para mensurar a glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) circulantes. Para a visita de coleta de sangue para realizar o aquecimento dos eritrócitos, o sangue foi coletado e separado em tubos, organizados nas condições de aquecimento: a 35°C e a 41°C. Após exposição ao calor, o plasma e os eritrócitos foram extraídos para análises de GSH e GSSG. Os resultados da temperatura corporal e do percentual de desidratação nas condições de exercício obtiveram aumentos significativos em todas as visitas. A frequência cardíaca teve aumento significativo nas condições calor comparada as condições termoneutro. A desidratação promoveu reduções significativas na GSH, independentemente da temperatura ambiente, resultando na alteração do balanço redox. Para os resultados da exposição isolada dos eritrócitos, o estresse térmico promoveu aumento dos níveis de GSH. Em conclusão, os resultados sugerem que a desidratação durante o exercício no calor promove

alteração no balanço redox. Além disso, os eritrócitos regulam a liberação de GSH durante exposição ao calor .

Palavras-chave: hidratação, hipertermia, antioxidante, glutathiona, estresse oxidativo

ABSTRACT

Exercise, hyperthermia and dehydration are associated with the presence of redox imbalance. Glutathione (GSH) is an important marker of antioxidant defense and undergoes changes in its levels in response to exercise associated with hyperthermia and dehydration. However, the mechanisms by which an increase in circulating GSH levels occurs under these conditions are not yet known. The aims of the present study were to investigate the effects of exercise on heat with and without dehydration (in humans) and isolated thermal stress in erythrocytes (in vitro) on GSH metabolism. Ten physically active men performed exercise under four trials: thermoneutral + euhydration (T-EU); thermoneutral + dehydration (T-DE); heat + euhydration (H-EU); heat + dehydration (H-DE). The temperatures of the thermoneutral and heat conditions were, respectively, 23 °C and 38 °C. Participants performed moderate intensity exercise (60% $\text{VO}_{2\text{peak}}$) for 60 minutes. The specific gravity of urine was analyzed at the beginning of each trials. Heart rate and rectal temperature were monitored throughout trials. Body mass records to determine the percentage of dehydration were measured before and after exercise. Blood samples were taken to measure circulating reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). For the blood collection visit to warm the erythrocytes, the blood was collected and separated into tubes, organized under warming conditions: at 35 °C and at 41 °C. After exposure to heat, plasma and erythrocytes were extracted for GSH and GSSG analysis. Results of body temperature and dehydration percentage under exercise conditions showed significant increases in all trials. Heart rate had a significant increase in heat conditions compared to thermoneutral conditions. Dehydration promoted significant reductions in GSH, regardless of ambient temperature, resulting in redox imbalance. For the results of isolated erythrocyte exposure, thermal stress promoted increased GSH levels. In conclusion, the results suggest that dehydration during exercise in heat promotes redox imbalance. In addition, erythrocytes regulate GSH release during heat exposure.

Keywords: hydration, hyperthermia, antioxidants, glutathione, oxidative stress

4.1 INTRODUÇÃO

Está bem estabelecido que o exercício aeróbio induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O músculo esquelético ativo durante o exercício é considerado a principal fonte de formação de ERO (BAILEY et al., 2004). A elevada produção de ERO pela contração do músculo esquelético prejudica a manutenção do equilíbrio redox, favorecendo a promoção de um estado de estresse oxidativo (REID et al., 1992a, 1992b). A associação entre exercício, hipertermia e desidratação é demonstrado por também contribuir na formação de ERO e consequentemente de acentuar o desequilíbrio no balanço redox (HILLMAN et al., 2011; MESTRE-ALFARO et al., 2012; QUINDRY et al., 2013; LAIANO et al., 2012; SUREDA et al. (2015). Embora, a hipertermia e a desidratação demonstrem contribuir na formação ERO, é preciso entender melhor o comportamento de marcadores pro e antioxidante sobre essas circunstâncias, principalmente sobre as respostas observadas em marcadores circulatórios. Dentre os marcadores de respostas ao estresse oxidativo, o metabolismo da glutathiona (GSH) tem papel importante na compreensão do balanço redox.

A GSH é um importante marcador circulatório descrito na defesa antioxidante. Alterações nos níveis de GSH em resposta a situações nas quais desequilíbrio redox está presente demonstram a sua importância como mecanismo de defesa antioxidante (INAYAMA et al., 2002; LAITANO et a., 2010; GOHIL et al., 1988; FINAUD et al., 2006, LAITANO et al. 2016). Os estímulos provocados pelo exercício físico agudo e crônico são exemplos de situações nas quais ocorrem alterações nos níveis celulares e circulatórios de GSH (PARK; KWAK, 2016).

Assim como o exercício, a hipertermia e a desidratação demonstram promover alterações no metabolismo da GSH (OHTSUKA et al., 1994; LAITANO et al., 2010; HILLMAN et al., 2011; LAITANO et al., 2012). Ohtsuka et al. (1994), em um dos primeiros estudos em humanos a avaliar os danos induzidos por ERO durante exposição passiva ao calor, observaram que a imersão em água a uma temperatura de 42°C por 10 minutos resultou em diminuição significativa da glutathiona (GSH) diferentemente de quando a imersão em água ocorreu a 25°C, que resultou em aumento da GSH nos glóbulos vermelhos. Por outro lado, parece que o

exercício quando associado ao calor atenua os esses efeitos oxidativos decorrentes da exposição ao calor, aumentando os níveis circulatórios de GSH.

Assim como o calor, o estado de desidratação resulta em modificações no metabolismo da GSH (Hillman et al., 2011; Laitano et al, 2012; Hillman et al., 2013). Apesar da dificuldade de isolar os efeitos da desidratação sobre esse marcador sem haver influência principalmente do aumento da temperatura corporal central, alguns estudos demonstram esse comportamento da GSH em situações de desidratação. Verificou-se que em situações de desidratação o aumento significativo da GSSG pós-exercício (HILLMAN et al., 2011) bem como a maior liberação de GSH no sangue durante exercício (LAITANO et al., 2012).

Apesar das evidências das alterações do metabolismo da GSH em resposta a associação exercício, calor e desidratação, os mecanismos pelos quais ocorre aumento dos níveis circulatórios de GSH ainda não estão claros. Neste estudo, verificamos a hipótese de que o aumento da GSH na circulação é resultante da sua liberação pelos eritrócitos em resposta ao calor. Portanto, os objetivos desse estudo foram investigar os efeitos do exercício no calor com e sem desidratação (em humanos) e do estresse térmico isolado nos eritrócitos (in vitro) sobre o metabolismo da GSH.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.2 Participantes

Dez homens fisicamente ativos foram recrutados para participar do estudo. As características físicas dos participantes estão descritas na tabela 1. Todos os participantes realizavam exercícios no mínimo três vezes por semana. Nenhum dos participantes estava envolvido em treinamento regular para uma determinada modalidade esportiva. Os participantes visitaram o laboratório para a realização de dois protocolos experimentais. O primeiro foi realizado para determinar os níveis circulatórios de glutathiona reduzida e oxidada durante o exercício no calor com e sem desidratação, no qual os participantes visitaram o laboratório em cinco ocasiões (uma visita preliminar e quatro experimentais com realização de exercício) separadas por pelo menos 4 e no máximo 7 dias. O segundo protocolo (aquecimento dos eritrócitos isoladamente) consistiu apenas da coleta de sangue dos participantes para ser determinada a contribuição dos eritrócitos na liberação da glutathiona reduzida em resposta à exposição ao calor. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade, sob o número 2.522.075, e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido após serem informados sobre os riscos e benefícios envolvidos na pesquisa. Todos os procedimentos estão em conformidade com o código de Ética da Associação Médica (Declaração de Helsinki).

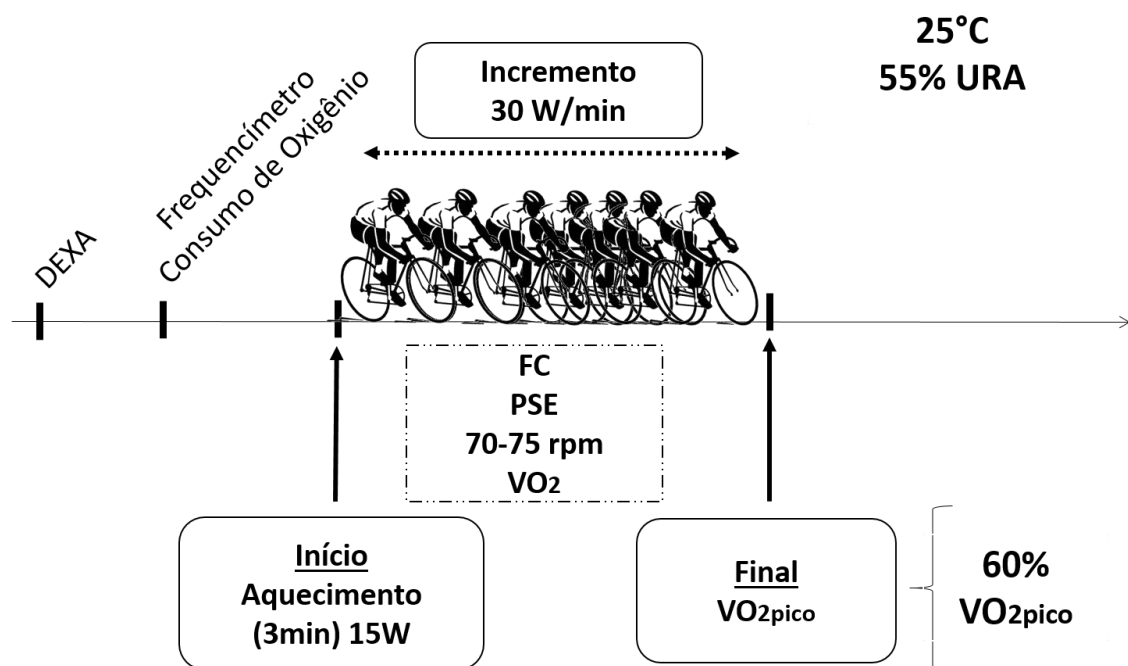
Tabela 1. Características físicas dos participantes (média \pm DP) (n=10).

| Características | Valor |
|--|-----------------|
| Idade (anos) | 26 \pm 3.7 |
| Estatura (cm) | 177 \pm 0.1 |
| Massa corporal (kg) | 79.7 \pm 8.8 |
| Percentual de gordura (%) | 22.3 \pm 4.5 |
| VO _{2pico} (ml . kg ⁻¹ . min ⁻¹) | 40.81 \pm 4.7 |
| Carga máxima (W) | 288 \pm 40.5 |

4.2.3 Visita preliminar

Durante a primeira visita, os participantes realizaram uma avaliação antropométrica (DEXA) e em seguida um teste incremental até a exaustão (ERGO-FIT, Pirmasens, Germany), com cadência constante entre 70 e 75 rpm (Figura 1). O teste incremental foi realizado para determinar o $VO_{2\text{pico}}$ (Quark CPET, Cosmed, Italy) e assim foi determinado a intensidade das sessões subsequentes (60% $VO_{2\text{pico}}$). A carga inicial foi de 30W com incrementos de 30W/min até a exaustão. O teste incremental foi realizado em ambiente com temperatura de 25°C e 55% de umidade relativa do ar. Nesta visita, os participantes foram orientados a registrar sua ingestão alimentar de 24 horas e foi solicitado que repetissem a mesma ingestão antes das visitas seguintes. A intensidade do exercício foi determinada para garantir que todos os participantes realizassem o mesmo trabalho relativo durante as visitas experimentais. Para a visita preliminar foi solicitado que os participantes consumissem ~1 hora antes da visita 5ml de água/kg de massa corporal para garantir o estado de euhidratação. O registro da massa corporal foi realizado previamente ao teste incremental sendo este valor considerado a massa corporal padrão para ser calculado o percentual de desidratação dos participantes antes de cada visita experimental.

Figura 1. Ordem cronológica do teste incremental até exaustão.

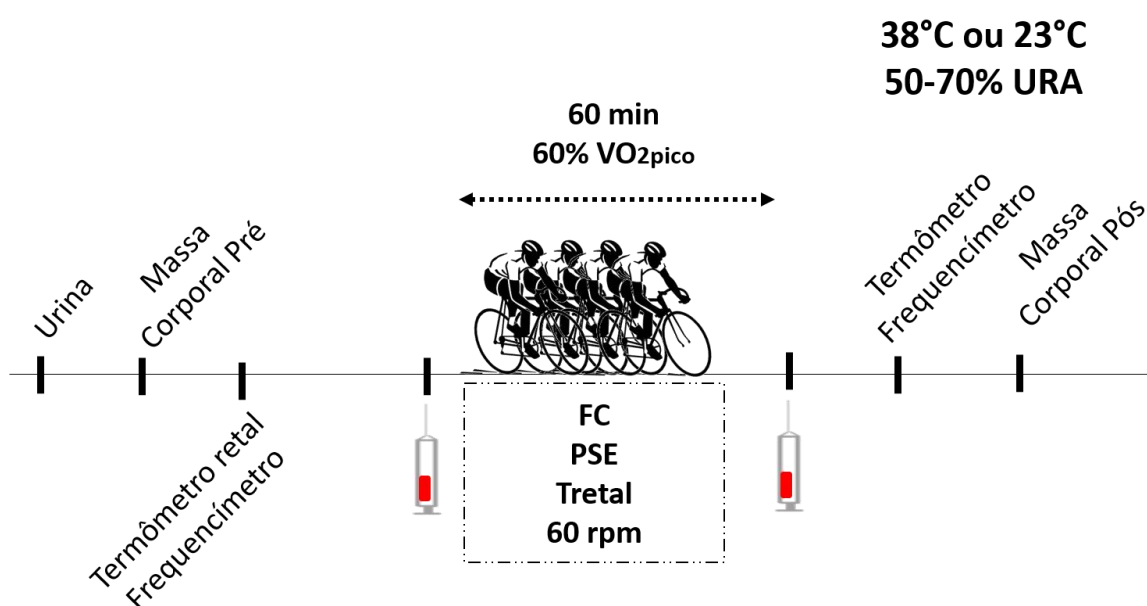


4.2.4 Visitas experimentais

Quatro dias após a visita preliminar, os participantes retornavam ao laboratório para realizar a primeira visita experimental. As quatro visitas experimentais consistiam na realização de 60 minutos de ciclismo a 60% do $VO_{2\text{pico}}$ (determinado durante o teste máximo) em diferentes condições de temperatura e hidratação. As sessões experimentais foram realizadas em temperatura elevada (38.0 ± 0.9 °C) no estado de euhidratação (C-EU) e desidratação (C-DE), e em ambiente temperado (23.0 ± 1.0 °C) euhidratado (T-EU) e desidratado (T-DE). A umidade relativa do ar durante as sessões ficou entre 50 e 70%. As sessões de exercício no calor foram realizadas em uma câmara ambiental (Russells, Holland). As visitas foram randomizadas e foram realizadas com intervalo de 4 a 7 dias. O estado de hidratação dos voluntários foi determinado antes da sessão de exercício. Para isso, foram adotados os seguintes protocolos: 1) na condição euhidratado, os voluntários foram orientados a consumir ~1 hora antes da visita 5ml de água/kg de massa corporal; 2) na condição desidratado, os voluntários foram orientados a não ingerir líquidos durante as 10 horas que antecederiam a visita experimental. A determinação do estado de hidratação prévio ao exercício dos participantes foi determinada pela gravidade específica da urina (ARMSTRONG et al., 2010). Assim que os participantes chegavam ao laboratório, era solicitado que esviassem a bexiga e assim uma amostra de urina era utilizada para a determinação da gravidade específica da urina (refratômetro). Após o registro da gravidade específica da urina, era feito o registro da massa corporal pré-exercício para a determinação do percentual de desidratação dos participantes durante as condições experimentais. Logo após a primeira coleta de sangue era realizada (5ml) da região anticubital enquanto os participantes estavam confortavelmente sentados. A coleta de sangue pré e pós-exercício foi utilizada para determinação da hemoglobina, hematócrito e para as análises da glutatona reduzida e oxidada. Em seguida, os participantes eram instruídos a realizar a autoinserção (10 cm além do esfíncter anal) do termômetro retal (Physitemp, New Jersey, USA). Durante as sessões não houve reidratação durante o exercício. Imediatamente após o exercício, uma nova coleta de sangue era realizada, seguida de uma coleta de urina e registro da massa corporal pós-exercício. Durante o exercício a frequência cardíaca (Polar, S610, Polar

Electro) e a percepção subjetiva de esforço (BORG, 1982) foram continuamente registradas. Foi solicitado que os participantes não realizassem exercícios físicos nas 24h que antecediam as visitas experimentais. Nenhum dos participantes estava realizando suplementação com antioxidantes e foi solicitado que evitassem mudanças drásticas nos hábitos alimentares e de exercícios regulares durante o estudo.

Figura 2. Ordem cronológica das visitas experimentais.



4.2.5 Preparação do sangue

Foi realizada a coleta de 5ml de sangue da região antecubital. Em um microtubo foi separado 1ml para a imediata análise de hemoglobina e para o preenchimento dos microcapilares para verificação do hematócrito e 4ml foram armazenados em um tubo com EDTA. A hemoglobina foi determinada por colorimetria (cianeto de hemoglobina–HiCN). O hematócrito foi determinado em quadruplicata por microcentrifugação. Com os valores de hemoglobina e hematócrito foram estimadas as alterações do volume plasmático ($\Delta\%$) (DILL; COSTILL, 1974). O tubo com 4ml do sangue remanescente foi centrifugado a 2730 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e separado

400µl do precipitado. Aos 400µl do precipitado foi adicionado 1600µl do ácido sulfossalicílico (5%) e realizada uma nova centrifugação a 5000rpm por 10 minutos a 4°C. Após essa nova centrifugação, 630µl do precipitado foi separado e se adicionou 70µl de H₂O. Em seguida, o microtubo com a preparação foi imediatamente congelado. Para as análises da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi utilizado um kit (Sigma–Aldrich Company Ltd., Dorset, England) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.6 Procedimento de coleta do sangue, aquecimento e preparação dos eritrócitos

Este procedimento consistiu do segundo experimento do estudo no qual foi realizado apenas a coleta de sangue dos participantes para ser determinada a contribuição dos eritrócitos na liberação da glutathiona reduzida em resposta à exposição ao calor, sendo realizado após a finalização da primeira parte da pesquisa. Foi realizada a coleta de sangue de oito voluntários. Os voluntários estavam previamente euhidratados e foram orientados a não realizar exercícios vigorosos nas 24h que antecedia essa coleta. O sangue (20ml) foi coletado da região antecubital, em repouso, e armazenados em tubos com K3-EDTA. O sangue coletado foi dividido em tubos. Desses, ainda foram separadas alíquotas para a imediata análise de hemoglobina por colorimetria (cianeto de hemoglobina–HiCN), utilizada posteriormente para a correção dos valores de glutathiona. Os tubos foram expostos a diferentes temperaturas: 35°C e 41°C, por um período de 30 minutos. Assim, os tubos foram divididos de acordo com a temperatura que foram aquecidos. Desse modo, os tubos foram divididos assim: 1) 35°C; e 2) 41°C. Após a exposição ao calor, o plasma e os eritrócitos foram extraídos por centrifugação, e imediatamente congelados. Para as análises da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi utilizado um kit (Sigma–Aldrich Company Ltd., Dorset, England) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.7 Análises Estatísticas

Todos os dados foram apresentados em média e desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade das variâncias através do teste de Levene. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de modelo misto para análise dos dados do experimento em humanos com a utilização do teste Post Hoc de Tukey. Para a análises dos dados do experimento nos eritrócitos (in vitro) foi realizado o teste t pareado para análise de dados paramétricos e para os não- paramétricos foi utilizado o Wilcoxon. Para fins de teste de hipóteses, o nível de confiança de 95% foi predeterminado como o critério mínimo para denotar uma diferença estatística ($p < 0,05$). Todas as análises de dados foram realizadas no SPSS 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 *Temperatura corporal, estado de hidratação e frequência cardíaca*

A temperatura corporal aumentou significativamente em todas as condições experimentais quando comparado ao repouso (Tabela 2). Nas condições que o exercício foi realizado no calor sem e com desidratação os aumentos da temperatura retal foram de 1°C e 1.2°C, respectivamente. Para massa corporal também foram observadas alterações similares entre as condições, ocorrendo diminuição significativa da massa corporal após o exercício (Tabela 2). O percentual de desidratação aumentou em todas as condições após o exercício (Tabela 2). O aumento no Hb após o exercício ocorreu em todas as condições, porém no Htc houve aumento significativo apenas nas condições de exercício em ambiente quente. Essas alterações no Hb e Htc não promoveram alterações no volume plasmático (Tabela 2). Em relação à frequência cardíaca, o exercício no calor promoveu aumento significativo após a metade do tempo de exercício quando comparado ao exercício em ambiente termoneutro, independentemente do estado prévio de desidratação (Figura 3).

4.3.2 Efeitos do exercício, do calor e da desidratação sobre a glutathiona circulante

Na condição em que o exercício foi realizado em ambiente termoneutro sem desidratação (T-EU) não houve mudanças nas concentrações de GSH e GSSG, o que consequentemente também não alterou a razão GSH/GSSG (Figura 4). Por outro lado, para a condição exercício em ambiente termoneutro com desidratação (T-DE) houve reduções significativas nas concentrações de GSH e na razão GSH/GSSG (Figura 4). Para a condição exercício no calor sem desidratação (C-EU) não houve alterações significativas para nenhuma das variáveis. No entanto, para a condição exercício no calor com desidratação (C-DE), foram observadas reduções significativas nas concentrações de GSH e GSSG. A razão GSH/GSSG também teve redução significativa na condição C-DE (Figura 4).

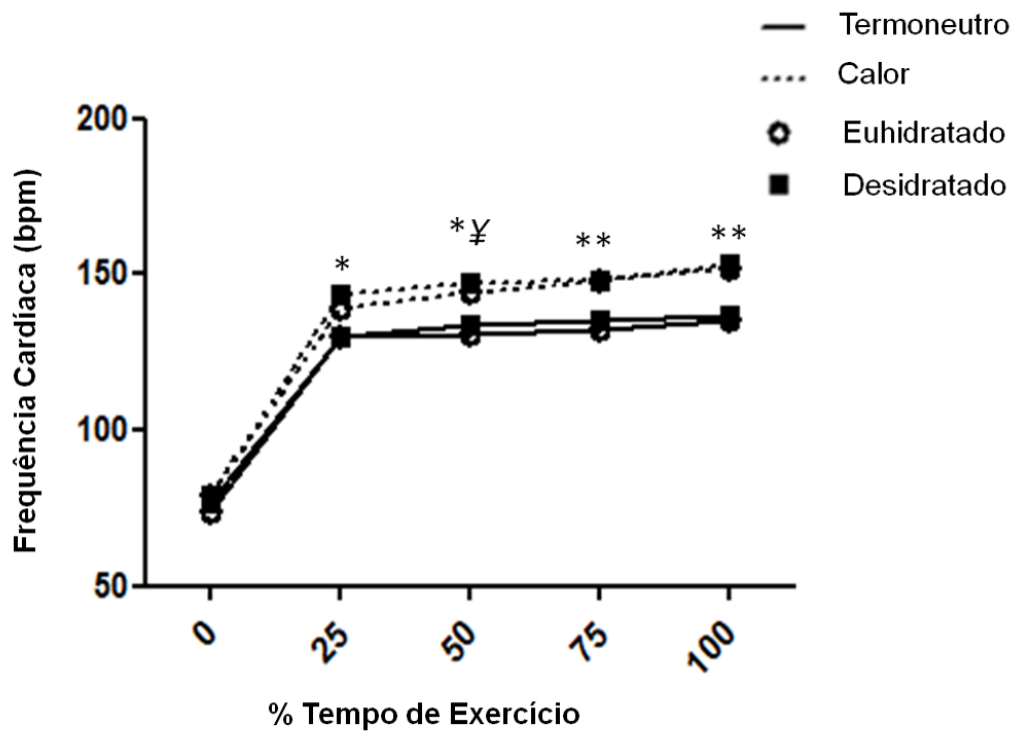
Tabela 2. Alterações na gravidade específica da urina (GEU), hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), volume plasmático (VP em %), massa corporal total (MC), taxa de sudorese (TxS), percentual de desidratação (Des), e temperatura retal (Tr), após 60 min de exercício durante as quatro condições experimentais. Dados em média e desvio padrão.

| | Termoneutro | | | | Calor | | | |
|------------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | Euhidratado (T-EU) | | Desidratado (T-DE) | | Euhidratado (C-EU) | | Desidratado (C-DE) | |
| | Repouso | Exercício | Repouso | Exercício | Repouso | Exercício | Repouso | Exercício |
| GEU | 1.020±0.006 | 1.018 ± 0.009 | 1.027± 0.006 | 1.028 ± 0.005 | 1.019± 0.008 | 1.022 ± 0.008 | 1.026±0.004 | 1.027 ± 0.004 |
| Hb (g/dL) | 15.6 ± 0.7 | 16.9 ± 1.1* | 16.1 ± 1.6 | 17.8 ± 1.2* | 15.9 ± 1.6 | 17.8 ± 1.4* | 15.6± 2.9 | 17.3± 3.1* |
| Htc (%) | 45.1 ± 1.1 | 46.2 ± 2.5 | 45.7 ± 3.2 | 46.8 ± 2.6 | 45.3 ± 2.6 | 47.2 ± 2.3* | 45.9 ± 2.8 | 47.2± 2.8* |
| VP (%) | — | - 9.4 ± 7.5 | — | - 11.4 ± 4.1 | — | - 13.6 ± 7.8 | — | - 12.3 ± 6.3 |
| MC (kg) | 80.1 ± 9.1 | 79.2 ± 9.1* | 79.4 ± 9.4 | 78.7 ± 9.5* | 79.9 ± 8.8 | 78.8 ± 8.8* | 79.4 ± 8.9 | 78.4± 8.9* |
| TxS (l/h) | — | 0.83 ± 0.3 | — | 0.65 ± 0.2 | — | 1.2 ± 0.5‡ | — | 1.03±0.43 |
| Des (%) | 0 ± 0.6 | 1.0 ± 0.9* | 0.91 ± 0.8 | 1.8 ± 1.1* | 0.1 ± 0.7 | 1.6 ± 0.7* | 0.81 ± 1.2 | 2.1± 1.2* |
| Tr (°C) | 36.9 ± 0.4 | 37.6 ± 0.5* | 37.0 ± 0.3 | 37.8 ± 0.3* | 37.0 ± 0.4 | 38.0 ± 0.5* | 36.8 ± 0.2 | 38.0± 0.5* |

* Diferente significativamente de repouso ($p < 0,05$)

‡ Diferente significativamente de DE-T ($p < 0,05$)

Figura 3. Respostas da frequência cardíaca durante as visitas experimentais.



* C-DE diferente significativamente de T-EU e T-DE ($p < 0,05$).

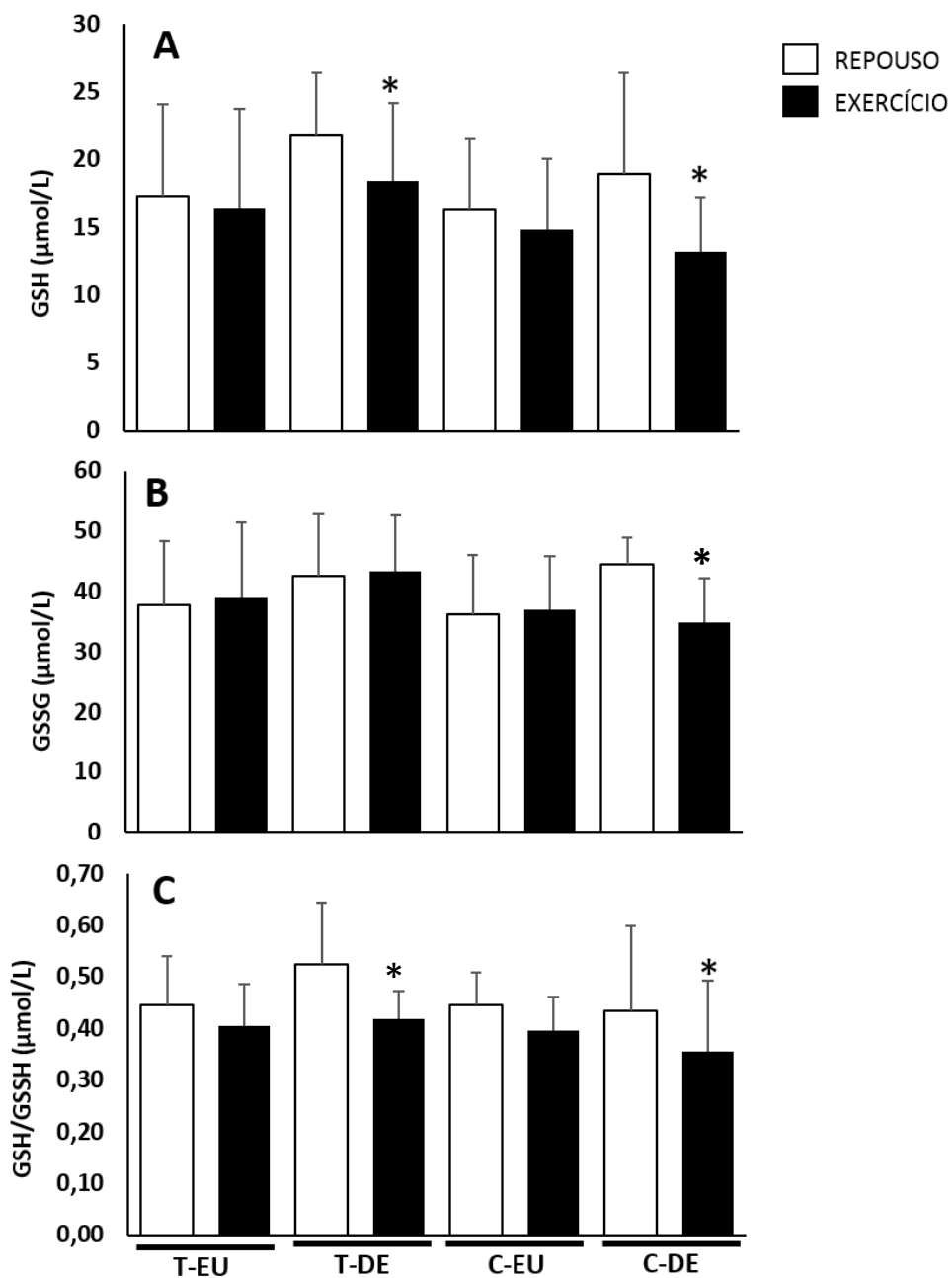
¥ C-EU diferente significativamente de T-EU ($p < 0,05$).

** C-DE e C-EU diferente significativamente de T-EU e T-DE ($p < 0,05$).

4.3.3 Efeitos do estresse térmico nos eritrócitos sobre a liberação de glutathiona

As análises do plasma não apresentaram diferenças significativas quanto a GSH, GSSG e a razão GSH/GSSG quando comparado o aquecimento do sangue a 35°C e 41°C (Figura 5). Para as análises na papa de hemácias houve aumento significativo na GSH quando o sangue foi aquecido à 41°C comparado ao aquecimento a 35°C (Figura 6). Por outro lado, não houve alteração significativa quanto a GSSG e a razão GSH/GSSG.

Figura 4. Efeitos do exercício realizado no calor e em ambiente termoneutro com ou sem desidratação sobre a glutathiona reduzida (A), glutathiona oxidada (B) e da razão GSH/GSSG (C) no repouso e após o exercício. Valores em média \pm DP.



* Diferente significativamente do repouso ($p < 0,05$).

Figura 5. Efeitos do estresse térmico isolado nos eritrócitos sobre os valores de glutathiona reduzida (A), glutathiona oxidada (B) e da razão GSH/GSSG (C) no plasma.

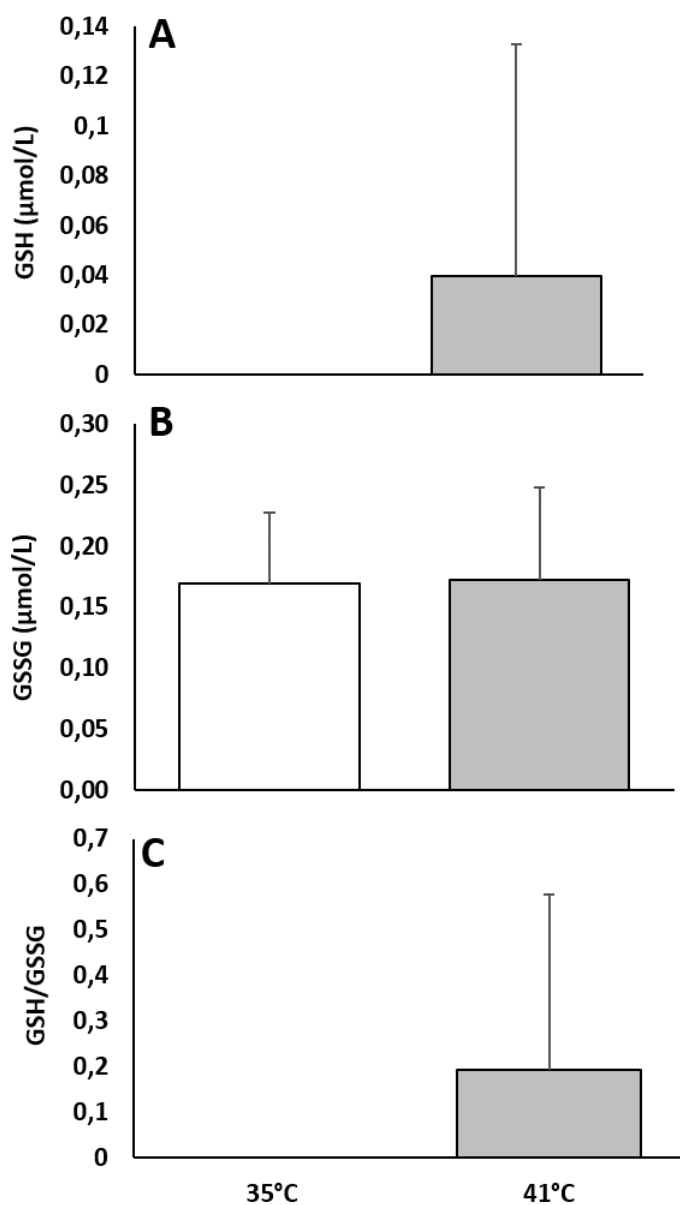
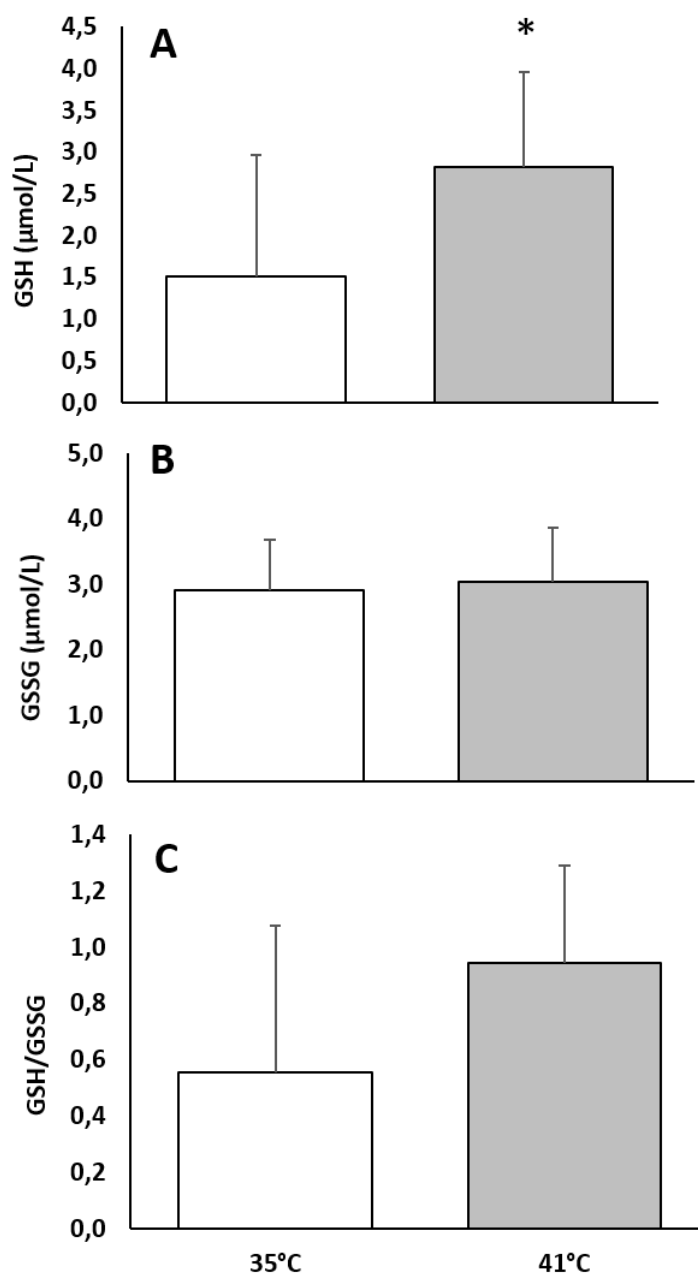


Figura 6. Efeitos do estresse térmico isolado nos eritrócitos sobre os valores de glutatona reduzida (A), glutatona oxidada (B) e da razão GSH/GSSG (C) na papa de hemácias.



* Diferente significativamente de 35°C ($p < 0,05$).

4.4 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do exercício no calor com e sem desidratação, e do estresse térmico isolado em eritrócitos sobre o metabolismo da glutathiona. Primeiro foi observado que o exercício realizado no estado de desidratação, independente da temperatura, promove desequilíbrio no balanço redox. Em segundo lugar, demonstramos que os eritrócitos contribuem nas alterações do metabolismo da glutathiona em situações de estresse térmico isolado. No nosso conhecimento este é o primeiro estudo que investigou diretamente a liberação de GSH por eritrócitos durante estresse térmico isolado.

Os exercícios contínuos por si, em decorrência da produção metabólica de calor pelos músculos ativos promovem aumento da temperatura corporal central. Quando o exercício é associado ao calor esse aumento da temperatura central é acentuado e conseqüentemente aumenta os níveis de desidratação induzida pelo exercício (MAUGHAN; WATSON; SHIRREFFS, 2015). Os nossos resultados corroboram com diversos estudos da literatura que demonstram o aumento da temperatura corporal central em consequência do tempo de exercício e da temperatura ambiente em que o exercício é realizado (SAWKA et al., 2011; CHEUVRONT; KENEFICK, 2014). Assim como os dados da temperatura corporal, as alterações observadas nos valores de massa corporal e de percentual de desidratação corroboram com a literatura. Houve reduções significativas da massa corporal que resultou no aumento do percentual de desidratação em todas as condições experimentais. Em relação a frequência cardíaca, os nossos resultados também corroboraram com o que é amplamente descrito na literatura. O exercício realizado em ambientes com temperatura elevada promove aumento significativo na frequência cardíaca quando comparado a prática de exercícios em ambiente termoneutro (GONZÁLEZ-ALONSO; CRANDALL; JOHNSON, 2008).

O calor e a desidratação são considerados fatores importantes de estresse fisiológico durante o exercício. Os seus efeitos combinados ou não sobre o metabolismo da glutathiona tem sido investigado em estudos prévios em humanos. Hillman et al. (2011) demonstraram que o exercício realizado em estado de desidratação ($\geq 3\%$), independente da temperatura ambiente, resultou em um aumento de 29% de GSSG. Por outro lado, quando o exercício é realizado no estado de euhidratação esse aumento foi atenuado. No presente estudo, não houve

aumento da GSSG nas condições de desidratação. Foi observado na condição calor associado a desidratação (C-DE) uma redução significativa da GSSG, acompanhada de uma diminuição da GSH. Essas reduções, conseqüentemente, alteraram a razão GSH/GSSG promovendo desequilíbrio redox. Assim como na condição calor e desidratação, houve reduções da GSH e da razão GSH/GSSG na condição termoneutra e desidratação (T-DE). Esses achados demonstram que a desidratação, independentemente da temperatura que o exercício é realizado promove desequilíbrio redox em virtude de uma diminuição da GSH e conseqüentemente da razão GSH/GSSG. Os estudos de Laitano et al. (2010, 2012) e Hillman et al. (2011, 2013) demonstraram os mesmos resultados, enfatizando que a desidratação é o principal fator que leva ao desequilíbrio redox.

Os níveis de desidratação atingidas no presente estudo são considerados desidratação leve (2%). Os estudos que demonstraram aumento nos níveis circulatórios de GSSG, ou seja, caracterizando um aumento da resposta pró oxidante induzida pela desidratação durante o exercício, atingiram níveis de desidratação igual ou superior a 3%. Esse maior percentual de desidratação resulta em modificações no volume plasmático que conseqüentemente pode modificar os valores de GSSG circulante. No nosso estudo, não foi observada diferença significativa no volume plasmático, o que pode explicar, além do nível de desidratação atingido (de 2%) a redução nos níveis circulatórios de GSSG.

Além dos efeitos do nível de hidratação sobre o metabolismo da glutathiona, é investigado o efeito que o exercício nessas condições de desidratação e calor promove sobre os níveis circulatórios de GSH. Laitano et al., (2012) demonstraram que a desidratação moderada (3,5%) promoveu liberação significativa de GSH na circulação durante o exercício moderado. Em outro estudo realizado por Laitano et al. (2010) que investigou os efeitos isolados do exercício no calor, ou seja, sem desidratação, demonstrou que o exercício moderado no calor promove liberação de GSH na corrente sanguínea. Dessa forma, esses dois estudos discutem o papel do exercício como um agente protetor ao atenuar uma resposta pró oxidante decorrente de estresses fisiológicos (ex. calor e desidratação) ao aumentar a resposta antioxidante, observada pelo aumento das concentrações de GSH circulantes. No presente estudo os resultados corroboram com esses achados. Foi demonstrado

que o exercício quando realizado no calor sem desidratação (C-EU) não promove alterações no balanço redox.

O tipo de exercício pode ser um fator importante nas respostas dos níveis circulatórios de glutathiona durante condições de calor e desidratação. O tipo de exercício do presente estudo difere do utilizado nos estudos anteriormente citados (LAITANO et al., 2010; LAITANO et al., 2012). Os autores utilizaram exercício isolado (extensão de joelho) para investigar essas alterações. Já no presente estudo, foi utilizado a ação muscular simultânea dos membros inferiores (ciclismo). Embora os exercícios sejam de intensidade moderada, as alterações nas concentrações de glutathiona pode ser influenciada direta ou indiretamente pelo tipo de exercício, da ação muscular e até pela forma que a hipertermia é induzida (pelo exercício no calor ou apenas de forma passiva). Sabe-se que diferentes tecidos podem contribuir para essas mudanças nas concentrações de GSH, dessa forma, é importante compreender e comparar métodos de avaliação que investigam essas alterações.

Diferentes células têm sido propostas por disponibilizar GSH na corrente sanguínea durante o exercício. Resultados de estudos mais clássicos demonstraram que ocorre reduções nos níveis de GSH no fígado de animais durante o exercício (SEN et al., 1992, LEEWENBURGH et al., 1995, LEEWENBURGH et al., 1996), e que além disso, há aumentos de GSH no plasma e no músculo. Como os estudos em humanos até o momento investigaram apenas os níveis circulatórios de GSH, ainda não está claro qual ou quais fontes contribuem para liberação de GSH durante o exercício, especificamente durante o exercício no calor e na presença de desidratação. Observamos com esta pesquisa que existem alterações significativas no metabolismo de GSH após aquecimento (41°C) de eritrócitos, ou seja, os eritrócitos respondem ao fator calor modificando as concentrações de GSH. Quando exposto a temperatura de 41°C, as análises realizadas na papa de hemácias demonstraram aumento da GSH. Sobre o possível mecanismo envolvido na regulação de GSH pelos eritrócitos, Ellison e Richie Jr. (2012) investigaram o papel da MRP1 na regulação dos níveis de GSH nos eritrócitos. Esses autores observaram que a MRP1 regula os níveis de GSH nos eritrócitos, e que ainda, há também o efluxo (parcialmente) de GSSG por essa bomba que parece ser dependente da GSH, o que resulta influenciando os níveis de GSH nos eritrócitos.

Sendo assim, parece que há de fato uma contribuição dos eritrócitos na liberação de GSH, e que isso também ocorre durante exposição ao calor. No entanto, é preciso investigar quais os mecanismos envolvidos na liberação de GSH durante a exposição ao calor e se a MRP1 também está envolvida nesse processo.

O presente estudo não analisou os níveis enzimáticos da glutathiona redutase e peroxidase. Essas análises poderiam esclarecer melhor os resultados encontrados sobre os níveis de GSH nos eritrócitos após o estresse térmico. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar as fontes de liberação de GSH durante o exercício, principalmente em situações de estresses como o calor e a desidratação, uma vez que está claro que essa associação promove modificações sobre o metabolismo da GSH. Fatores como o tipo de exercício, duração, intensidade, níveis de desidratação, grupos experimentais diferentes, condicionamento físico dos participantes deve ser considerado em futuras pesquisas.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a realização de exercício moderado em estado de desidratação, independente da temperatura ambiente, promove desequilíbrio redox. Além disso, concluiu-se também que os eritrócitos após exposição a estresse térmico liberam GSH.

5 CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese tentou elucidar, em parte, as fontes de liberação e regulação dos níveis circulatórios de glutathiona durante o exercício moderado no calor, uma vez que é demonstrado uma resposta protetora do exercício sobre marcadores antioxidantes durante o estresse térmico. Em resumo, observou-se que a desidratação, e não o calor, induz desequilíbrio redox durante o exercício moderado em decorrência de uma diminuição dos níveis circulatórios de GSH, promovendo assim diminuição da razão GSH/GSSG. Além disso, observou-se que o estresse térmico isolado em eritrócitos induziu a maior liberação de GSH, sugerindo que os eritrócitos contribuem na defesa antioxidante em situações de hipertermia durante o exercício. Apesar de elucidar parte das respostas antioxidantes associadas ao exercício moderado no calor, futuras pesquisas devem investigar outras fontes

diretas de liberação de GSH após estresse térmico, como por exemplo, a contribuição do músculo esquelético no aumento da defesa antioxidante. Além disso, outras pesquisas devem analisar a atividade de enzimas que regulam os níveis de GSH durante a exposição de eritrócitos ao calor, como também da atividade da proteína associada à resistência a múltiplas drogas 1 (MRP1), correlacionando a sua atividade com os valores de GSH nessas células.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, Lawrence E. et al. Human hydration indices: acute and longitudinal reference values. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, v. 20, n. 2, p. 145-153, 2010.
- BARYCKI, J. J. et al. Antioxidant molecules and redox cofactors. *Redox biochemistry*, p. 11-47, 2007.
- BAILEY, D. M. et al. Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 287, n. 4, p. H1689-H1699, 2004.
- BANERJEE, R. Redox metabolism and life. *Redox Biochemistry*, p. 1-9, 2007.
- BENTLEY, D. J. et al. Acute and Chronic Effects of Antioxidant Supplementation on Exercise Performance. *Antioxidants in Sport Nutrition*, p. 141, 2014.
- BERNABUCCI, U. et al. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of dairy science*, v. 85, n. 9, p. 2173-2179, 2002.
- BORG, G. A. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med sci sports exerc*, v. 14, n. 5, p. 377-381, 1982.
- BOUCHAMA, A.; KNOCHEL, J. P. Heat stroke. *New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 25, p. 1978-1988, 2002.
- CALDERWOOD, S. K. et al. Heat shock stimulates the release of arachidonic acid and the synthesis of prostaglandins and leukotriene B4 in mammalian cells. *Journal of cellular physiology*, v. 141, n. 2, p. 325-333, 1989.
- CONNES, P. et al. Exercise hemorheology: classical data, recent findings and unresolved issues. *Clinical hemorheology and microcirculation*, v. 53, n. 1-2, p. 187-199, 2013.
- CHEUVRONT, S. N.; KENEFICK, R. W. Dehydration: physiology, assessment, and performance effects. *Comprehensive Physiology*, 2014.
- CHEUVRONT, S. N. et al. Mechanisms of aerobic performance impairment with heat stress and dehydration. *Journal of Applied Physiology*, v. 109, p. 1989–1995, 2010.
- CRANDALL, C. G.; GONZÁLEZ-ALONSO, J. Cardiovascular function in the heat-stressed human. *Acta Physiologica*, v. 199, n. 4, p. 407-423, 2010.
- DAVIES, K. J. A. et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982.
- DEKKERS, J. C.; VAN DOORNEN, L. J. P.; KEMPER, H. C. G. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports medicine*, v. 21, n. 3, p. 213-238, 1996.

- DILL, D. B.; COSTILL, D. L. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *Journal of Applied Physiology*, v. 37, n. 2, p. 247-248, 1974.
- FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2009.
- FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress. *Sports medicine*, v. 36, n. 4, p. 327-358, 2006.
- GONZÁLEZ-ALONSO, J. et al. Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. *Journal of Applied Physiology*, v. 86, n. 3, p. 1032-1039, 1999.
- GONZÁLEZ-ALONSO, J.; CRANDALL, C. G.; JOHNSON, J. M. The cardiovascular challenge of exercising in the heat. *Journal Physiology*, v. 586, n. 1, p. 45-53, 2008.
- GOLDEN, T. R.; HINERFELD, D. A.; MELOV, S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging cell*, v. 1, n. 2, p. 117-123, 2002.
- GOHIL, K. et al. Blood glutathione oxidation during human exercise. *Journal of Applied Physiology*, v. 64, n. 1, p. 115-119, 1988.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HALL, D. M. et al. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 280, n. 2, p. H509-H521, 2001.
- HILLMAN, A. R. et al. Exercise-induced dehydration with and without environmental heat stress results in increased oxidative stress. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 36, n. 5, p. 698-706, 2011.
- HILLMAN, A. R. et al. A comparison of hyperhydration versus ad libitum fluid intake strategies on measures of oxidative stress, thermoregulation, and performance. *Research in Sports Medicine*, v. 21, n. 4, p. 305-317, 2013.
- INAYAMA, T. et al. Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols. *Life sciences*, v. 70, n. 17, p. 2039-2046, 2002.
- KING, M. A.; CLANTON, T. L.; LAITANO, O. Hyperthermia, dehydration, and osmotic stress: unconventional sources of exercise-induced reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 310, n. 2, p. R105-R114, 2016.
- KUSMIC, C. et al. The antioxidant drug dipyrindamole spares the vitamin E and thiols in red blood cells after oxidative stress. *Cardiovascular research*, v. 47, n. 3, p. 510-514, 2000.

- LAITANO, O. et al. Pharmacological targeting of mitochondrial reactive oxygen species counteracts diaphragm weakness in chronic heart failure. *Journal of Applied Physiology*, v. 120, n. 7, p. 733-742, 2016.
- LAITANO, O. et al. Separate and combined effects of heat stress and exercise on circulatory markers of oxidative stress in euhydrated humans. *European journal of applied physiology*, v. 110, n. 5, p. 953-960, 2010.
- LAITANO, O. et al. Effects of graded exercise-induced dehydration and rehydration on circulatory markers of oxidative stress across the resting and exercising human leg. *European journal of applied physiology*, v. 112, n. 5, p. 1937-1944, 2012.
- LEEUWENBURGH, Christiaan; JI, Li Li. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 316, n. 2, p. 941-949, 1995.
- LEEUWENBURGH, Christiaan; JI, Li Li. Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *The Journal of nutrition*, v. 126, n. 7, p. 1833-1843, 1996.
- LEVELS, K. et al. The effect of skin temperature on performance during a 7.5-km cycling time trial. *European Journal of Applied Physiology*, v. 112, n. 9, p. 3387-3395, 2012.
- LE MOAL, E. et al. Redox control of skeletal muscle regeneration. *Antioxidants & redox signaling*, 2017.
- LEHOUX, S. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovascular research*, v. 71, n. 2, p. 269-279, 2006.
- LEVERETT, L. B. et al. Red blood cell damage by shear stress. *Biophysical journal*, v. 12, n. 3, p. 257-273, 1972.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. *The Ukrainian Biochemical Journal*, n. 87, № 6, p. 11-18, 2015.
- MAUGHAN, R. J.; OTANI, H.; WATSON, P. Influence of relative humidity on prolonged exercise capacity in a warm environment. *European Journal of Applied Physiology*, v. 112, n. 6, p. 2313-2321, 2012.
- MAUGHAN, R. J.; SHIRREFFS, S. M.; WATSON, P. Exercise, heat, hydration and the brain. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 26, n. sup5, p. 604S-612S, 2007.
- MAUGHAN, R. J.; WATSON, P.; SHIRREFFS, S. M. Implications of active lifestyles and environmental factors for water needs and consequences of failure to meet those needs. *Nutrition Reviews*, v. 73, n. suppl 2, p. 130-140, 2015.
- MESTRE-ALFARO, A. et al. Body temperature modulates the antioxidant and acute immune responses to exercise. *Free radical research*, v. 46, n. 6, p. 799-808, 2012.

- MONTAIN, S. et al. Physiological tolerance to uncompensable heat stress: effects of exercise intensity, protective clothing, and climate. *Journal of Applied Physiology*, v. 77, n. 1, p. 216-222, 1994.
- NETHERY, D. et al. Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA 2 dependent. *Journal of Applied Physiology*, v. 87, n. 2, p. 792-800, 1999.
- NYBO, L. Hyperthermia and fatigue. *Journal of Applied Physiology*, v. 104, p. 871–878, 2008.
- OHTSUKA, Y. et al. Effect of thermal stress on glutathione metabolism in human erythrocytes. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, v. 68, n. 1, p. 87-91, 1994.
- OLIVER, S. R. et al. Thermal tolerance of contractile function in oxidative skeletal muscle: no protection by antioxidants and reduced tolerance with eicosanoid enzyme inhibition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 295, n. 5, p. R1695-R1705, 2008.
- OLIVER, S. R. et al. Hyperthermia induces injury to the intestinal mucosa in the mouse: evidence for an oxidative stress mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 302, n. 7, p. R845-R853, 2012.
- PARK, S.Y.; KWAK, Y. S. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. *Journal of exercise rehabilitation*, v. 12, n. 2, p. 113, 2016.
- PAIK, II.Y. et al. Fluid replacement following dehydration reduces oxidative stress during recovery. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 383, n. 1, p. 103-107, 2009.
- PARKIN, J. M. et al. Effect of ambient temperature on human skeletal muscle metabolism during fatiguing submaximal exercise. *Journal of applied physiology*, v. 86, n. 3, p. 902-908, 1999.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, n. 8, p. 457-465, 2012.
- POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.
- POWERS, S. K. et al. Dietary antioxidants and exercise. *Journal of sports sciences*, v. 22, n. 1, p. 81-94, 2004.
- POWERS, S. K.; TALBERT, E. E.; ADHIHETTY, P. J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, v. 589, n. 9, p. 2129-2138, 2011.

- QUINDRY, J. et al. Environmental temperature and exercise-induced blood oxidative stress. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, v. 23, n. 2, p. 128-136, 2013.
- RACINAIS, S. et al. Consensus recommendations on training and competing in the heat. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, v. 25, n. S1, p. 6-19, 2015.
- REID, M. B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *Journal of Applied Physiology*, v. 73, n. 5, p. 1797-1804, 1992a.
- REID, M. B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *Journal of Applied Physiology*, v. 73, n. 5, p. 1805-1809, 1992b.
- RISTOW, M. et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 21, p. 8665-8670, 2009.
- ROWELL, L. B. Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiological Reviews*, v. 54, n. 1, p. 75-159, 1974.
- ROWELL, L. B. Human circulation: regulation during physical stress. Oxford University Press, USA, 1986.
- ROSS, M. L. et al. Novel precooling strategy enhances time trial cycling in the heat. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 43, n. 1, p. 123-133, 2011.
- SAWKA, M. N. et al. Integrated physiological mechanisms of exercise performance, adaptation, and maladaptation to heat stress. *Comprehensive Physiology*, 2011.
- SAWKA, M.N. Physiological consequences of hypohydration: exercise performance and thermoregulation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 24, p. 657-70, 1992.
- SEN, CHANDAN K. et al. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *Journal of Applied Physiology*, v. 73, n. 4, p. 1265-1272, 1992.
- SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.
- SCHLADER, Z. J. et al. Skin temperature as a thermal controller of exercise intensity. *European Journal of Applied Physiology*, v. 111, n. 8, p. 1631-1639, 2011.
- SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 1988. p. 390-408.

- SOUZA-SILVA, A. A. et al. High intensity interval training in the heat enhances exercise-induced lipid peroxidation, but prevents protein oxidation in physically active men. *Temperature*, n. just-accepted, p. 00-00, 2015.
- SUREDA, A. et al. Exercise in a hot environment influences plasma anti-inflammatory and antioxidant status in well-trained athletes. *Journal of thermal biology*, v. 47, p. 91-98, 2015.
- SUREDA, A. et al. Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players. *British journal of sports medicine*, v. 43, n. 3, p. 186-190, 2009.
- SUND-LEVANDER, M.; FORSBERG, C.; WAHREN, L. K. Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review. *Scandinavian Journal of Caring Sciences*, v. 16, n. 2, p. 122-128, 2002.
- SHIBASAKI, M.; WILSON, T. E.; CRANDALL, C. G. Neural control and mechanisms of eccrine sweating during heat stress and exercise. *Journal Applied Physiology*, Bethesda, v. 100, n. 5, p. 1692-1701, 2006.
- THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, v. 16, n. 7, p. 716-718, 2000.
- VESKOUKIS, A. S. et al. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 10, p. 1371-1374, 2009.
- WELC, S. S.; CLANTON, T. L. The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ. *Experimental physiology*, v. 98, n. 2, p. 359-371, 2013.
- YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, v. 74, n. 1, p. 139-163, 1994.
- ZUO, L. et al. Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, v. 97, n. 2, p. 661-668, 2004.

APÊNDICE I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E DANÇA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO
R. Felizardo, 750 - Jardim Botânico, Porto Alegre - RS, 90690-200

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar como voluntário em uma pesquisa científica com o objetivo determinar as concentrações de glutathione (este é um marcador de proteção ao dano celular) no sangue durante o exercício no calor (38°C e 50% umidade relativa do ar) e em condição termoneutra (25°C e 50% umidade relativa do ar), com e sem desidratação e descrever os efeitos da temperatura (35° e 41°C) e da desidratação em células do sangue (eritrócitos) sobre a liberação de glutathione. Inicialmente, você responderá a um questionário de saúde para descartar qualquer tipo de doença cardiovascular, termorregulatória ou endócrina. Em seguida, você será submetido a uma bateria de avaliações para verificar o percentual de gordura, peso e estatura, e de um teste máximo, cuja intensidade será aumentada a cada minuto, e assim que você quiser encerrar o teste, ele será interrompido. Esse teste será realizado em uma bicicleta estacionária de modo que você alcance o seu esforço máximo. Quatro ou sete dias após esse teste você retornará ao laboratório e então iniciará as sessões em que você realizará exercício na bicicleta com uma intensidade de exercício determinada a partir da intensidade máxima alcançada no seu teste. Nessas sessões você estará sujeito a quatro situações diferentes em que poderá realizar exercício, onde essa condição só será conhecida no dia. Assim, em duas ocasiões você realizará exercício em uma câmara ambiental onde a temperatura será controlada (38°C ou 25°C). O que vai diferir as visitas além da temperatura da sala será o seu estado de hidratação que poderá ser desidratado ou não. Nas condições em que você estará desidratado, é importante

destacar que essa desidratação prévia é normalmente identificada. A pesquisa não te sujeitará a chegar a níveis de desidratação severa. Antes do exercício propriamente dito, serão realizados alguns procedimentos como: a coleta de 15ml de sangue, a auto inserção de um termômetro retal e de pele, e a colocação de um frequencímetro para a monitorização da frequência cardíaca durante o exercício. Em seguida, você se posicionará na bicicleta para realizar o exercício, que será conduzido em uma das quatro condições explicada anteriormente. Esta pesquisa esclarecerá as respostas fisiológicas sobre marcadores antioxidantes (importantes contra os danos celulares) durante o exercício no calor com e sem desidratação. Pelo fato das sessões serem compostas pela prática de exercício no calor e em estado de desidratação, você poderá apresentar alguns tipos de desconfortos tais como cansaço, eventuais dores musculares, tontura por queda na pressão arterial, náuseas e vômito. Nesses casos, o teste será interrompido imediatamente. Como vamos estar controlado sua temperatura corporal, se percebermos que ela está aumentando muito, acima dos 39°C, também encerraremos o teste mesmo não havendo a presença de nenhum sinal de desconforto. No entanto, se você sentir algum destes sintomas de desconforto, eles são normalmente de curta duração. Entretanto, em caso de alguma eventualidade, você receberá assistência e suporte dos pesquisadores e do médico que estará presente no laboratório durante os testes, garantindo o seu bem estar até o término da cada visita. No final e durante as visitas, especialmente das visitas com desidratação, forneceremos bebidas esportivas (isotônicas) e água para restabelecer o nível adequado de hidratação e assim evitar a presença de possíveis desconfortos. O tempo aproximado para completar cada visita será de duas horas e o período total para concluir as visitas deverá ser de um mês. Você poderá desistir de participar do projeto a qualquer momento, sem que seja necessário justificar o motivo da desistência para os pesquisadores. Todos os dados e informações obtidos durante a sua participação nesta pesquisa serão usados somente para divulgações científicas, sendo que a sua identidade não será revelada de maneira alguma. Após sua participação no estudo será fornecido um laudo com os resultados de todas as avaliações realizadas durante a pesquisa. Não será oferecido nenhum tipo de recompensa financeira pela sua participação na pesquisa. Você deverá assinar duas vias desse termo, na qual uma será mantida com você e a outra será arquivada pelos pesquisadores.

Qualquer emergência que ocorra com os participantes durante a realização do estudo será devidamente informada ao CEP no prazo de 24 horas.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____ Data: _____

Assinatura do pesquisador: _____ Data: _____

Dr. Prof. Alvaro Reischak de Oliveira
Telefone: 51-3308-5862

Prof^a. Denise de Melo Marins
Telefone: 51-9 83082157

Comitê de Ética em Pesquisa
Telefone: (51) 3308-3738