



**ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO
HUMANO
TESE DE DOUTORADO**

**EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO, DESIDRATAÇÃO E
REIDRATAÇÃO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM
HUMANOS NO REPOUSO E DURANTE O EXERCÍCIO**

ORLANDO LAITANO LIONELLO NETO

PORTO ALEGRE, SETEMBRO 2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE

L763e Lionello Neto, Orlando Laitano

Efeitos do estresse térmico, desidratação e reidratação sobre o estresse oxidativo em humanos no repouso e durante o exercício. / Orlando Laitano Lionello Neto. - Porto Alegre: Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

130 f.: il.

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, 2010.

1. Exercício. 2. Calor. 3. Hipertermia. 4. Estresse oxidativo. I. Título. II. Oliveira, Álvaro Reischak de, orientador. III. González-Alonso, José, orientador.

CDU: 796.012

“The same thing that makes you live can kill you in the end”.
Neil Young

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO
HUMANO**

**EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO, DESIDRATAÇÃO E
REIDRATAÇÃO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM
HUMANOS NO REPOUSO E DURANTE O EXERCÍCIO**

**Tese de doutorado
apresentada ao Programa
de Pós Graduação em
Ciências do Movimento
Humano como requisito
parcial para a obtenção do
título de Doutor em
Ciências do Movimento
Humano.**

**AUTOR: ORLANDO LAITANO LIONELLO NETO
ORIENTADOR: DR. ALVARO REISCHAK DE OLIVEIRA
CO-ORIENTADOR: DR. JOSÉ GONZÁLEZ-ALONSO**

PORTO ALEGRE, SETEMBRO 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO
HUMANO**

**EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO, DESIDRATAÇÃO E
REIDRATAÇÃO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM
HUMANOS NO REPOUSO E DURANTE O EXERCÍCIO**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Emerson Silami Garcia, PhD

Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr., PhD

Prof. Flávio Antônio de Souza Castro, PhD

AGRADECIMENTOS

Ao término de mais esta jornada, não poderia deixar de agradecer algumas pessoas sem as quais este sonho e trabalho não teriam sido realizados.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Orlando e Sílvia por terem sempre me apoiado e me orientado durante toda vida. Sou eternamente grato pela educação e pelos valores ensinados, os quais eu não abro mão sob hipótese alguma. À minha querida avó Lourdes – não existem palavras, vó, para descrever a sua importância na minha vida, simplesmente sem o seu apoio eu não teria chegado até aqui, muito obrigado! À minha irmã, melhor amiga e recentemente Enfermeira Kity pelo amor, carinho, amizade durante toda a vida. À Marluse pelo amor, paciência, amizade, confiança e companheirismo durante todos os momentos, mas principalmente durante esta jornada, quando tivemos que abrir mão de muitos momentos juntos para que este trabalho fosse realizado, e mesmo assim, tu continuas ao meu lado.

Ao Professor José González-Alonso pelos conhecimentos transmitidos, pelo brilhante suporte ao longo de todo o doutorado e também por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa na Brunel University, durante o doutorado sanduíche quando as coletas de dados desta tese foram realizadas. Ao Steven Trangmar e a Dra. Kam Kalsi pelo competente auxílio nas coletas de dados. Aos meus colegas e amigos Dr. James Pearson, Eric Stohr, Dr. Stéphane Dufour e Dr. David Low, que tornavam muito agradáveis os debates e discussões sobre os experimentos e resultados dos experimentos. Ao Dr. Lee Romer e Dr. Bryan Taylor pelas discussões fisiológicas sempre regadas a *pints* no “Load of Ray” (um pub localizado próximo a Brunel University). Ao Dr. Mark Pook que cedeu gentilmente a estrutura do seu laboratório para a realização das análises de sangue desta tese. E aos participantes das pesquisas

pela dedicação e participação em procedimentos extremamente invasivos. Sou extremamente grato por ter tido a oportunidade de trabalhar com todos vocês!

Ao Prof. Arthur Sacramento por ter despertado em mim, ainda na graduação, o amor pela fisiologia!

Aos funcionários do PPGCMH: Ana, Zane e André, sempre muito atenciosos e prontos para solucionar qualquer problema que estivessem ao alcance.

Aos funcionários do LAPEX: Alex, Luiz, Carla, Vanessa, Luciano, Rafa e a Rosângela (Dani) pela amizade e carinho além da competência. À Marcinha da higienização pelo carinho e amizade.

Aos meus muitos amigos e colegas de PPGCMH e LAPEX em especial ao Eduardo Cadore, Jocelito Martins (Dr. Bijoldo), Eraldo Pinheiro e Giovani Cunha (Pitiço). A todos os componentes da sala 212 do LAPEX (o maior pólo exportador “de mentes”) e aos Professores Ronei e Marco Vaz pelos conselhos e amizade. Aos colegas egressos do PPGCMH que estão espalhados pelo Brasil e pelo mundo: Dr. Felipe Carpes, Dr. Fernando Diefenthaler, Dr. Maurício Krause, Dra. Claudia Schneider, Lenice Zarth Carvalho e Rodrigo Bini.

Aos meus colegas de trabalho na UNIVASF: Rodrigo Carvalho, Alessandro Machado e Sérgio Moreira que apesar do pouco tempo de convivência contribuíram de alguma forma principalmente na fase de redação desta tese.

À Gatorade Sports Science Institute pelos financiamentos concedidos.

À Capes pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado no país.

Por último gostaria de expressar a minha gratidão especial a três pessoas que mudaram o curso da minha vida profissional depois de uma conturbada transição do mestrado para o doutorado: Professor Adroaldo Gaya, Dr. Marcelo Silva e ao meu

orientador Dr. Alvaro Reischak de Oliveira. Quero que saibam que vocês são muito importantes para mim e gostaria de dedicar esta tese a vocês! Muito Obrigado!

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado está estruturada da seguinte forma. Uma breve introdução apresentando o problema de pesquisa (CAPÍTULO I). Uma revisão de literatura (CAPÍTULO II) onde serão abordadas algumas informações importantes para o entendimento do assunto e os principais estudos publicados na literatura científica relacionados com o tema da tese seguido por um capítulo (CAPÍTULO III) delimitando os objetivos dos estudos. Posteriormente serão apresentados dois artigos originais intitulados: *“Efeitos separado e combinado do estresse térmico e exercício sobre marcadores circulatórios de estresse oxidativo em humanos euhidratados”* (CAPÍTULO IV) e: *“Efeitos da desidratação induzida pelo exercício e reidratação sobre marcadores de estresse oxidativo na circulação em repouso e durante o exercício.”* (CAPÍTULO V). Por fim, serão apresentadas no último capítulo (CAPÍTULO VI) as conclusões e direções dos estudos. Documentos complementares serão apresentados na seção ANEXOS no final do documento.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1 CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	16
2 CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Temperatura corporal e exercício físico.....	20
2.1.1 Métodos de medida da temperatura corporal e estresse térmico.....	22
2.1.2 Desidratação e reidratação.....	23
2.1.3 Mudanças no volume plasmático e sanguíneo durante o exercício, estresse térmico e desidratação.....	26
2.2 Radicais livres de oxigênio e estresse oxidativo.....	28
2.2.1 Isoprostanos como marcadores de lipoperoxidação.....	30
2.3 Defesa antioxidante.....	32
2.3.1 Superóxido Dismutases (SODs).....	32
2.3.2 Glutathiona.....	34
3 CAPÍTULO III – OBJETIVOS.....	39
4 CAPÍTULO IV – ARTIGO ORIGINAL: “Efeitos combinados e separados do estresse térmico e exercício sobre marcadores circulatórios de estresse oxidativo em humanos euhidratados”.....	41
4.1 Introdução.....	42
4.2 Materiais e métodos.....	44
4.2.1 Participantes.....	44

4.2.2	Visita preliminar.....	45
4.2.3	Visita principal.....	45
4.2.4	Preparação do sangue.....	47
4.2.5	Análises dos marcadores de estresse oxidativo.....	48
4.2.6	Análise estatística.....	49
4.3	Resultados.....	49
4.3.1	Temperatura e estado de hidratação.....	49
4.3.2	Efeitos isolados do exercício.....	50
4.3.3	Efeitos isolados do estresse térmico.....	51
4.3.4	Efeitos combinados do estresse térmico e exercício.....	52
4.4	Discussão.....	55
5	CAPÍTULO V – ARTIGO ORIGINAL “Efeitos da desidratação induzida pelo exercício e reidratação sobre marcadores de estresse oxidativo na circulação em repouso e durante o exercício”.....	63
5.1	Introdução.....	64
5.2	Materiais e métodos.....	66
5.2.1	Participantes.....	66
5.2.2	Visitas preliminares.....	66
5.2.3	Visita experimental principal.....	67
5.2.4	Medidas hemodinâmicas do membro inferior.....	69
5.2.5	Preparação do sangue.....	69
5.2.6	Análises dos marcadores de estresse oxidativo.....	70
5.2.7	Cálculos.....	71

5.2.8 Análise estatística.....	71
5.3 Resultados.....	71
5.3.1 Hidratação e mudanças na temperatura com desidratação e reidratação.....	71
5.3.2 Fluxo sanguíneo femoral em repouso e no exercício.....	74
5.3.3 Efeitos da desidratação leve.....	74
5.3.4 Efeitos da desidratação moderada.....	75
5.3.5 Efeitos da reidratação.....	75
5.4 Discussão.....	80
6 CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES E DIREÇÕES.....	85
7 REFERÊNCIAS.....	87
8 ANEXOS.....	103

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 1. Sistemas antioxidantes.....	38
TABELA 1. Hemodinâmica, temperaturas e massa corporal nas duas condições experimentais no repouso e durante o exercício (Estudo 1).....	51
TABELA 2. Variáveis hemodinâmica e eletrólitos no sangue venoso e arterial (Estudo 2).....	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Participante durante a visita principal no ergômetro de extensão de joelho unilateral vestindo a roupa de perfusão.....	47
FIGURA 2. Desenho experimental da visita principal (Estudo 1).....	48
FIGURA 3. Efeitos do estresse térmico sobre glutatona reduzida (a), oxidada (b) e razão gsh/gssg (c).....	53
FIGURA 4. Atividade da superóxido dismutase no eritrócito em repouso e durante o exercício nas condições controle e estresse térmico.....	54
FIGURA 5. Plasma isoprostanos em repouso e durante o exercício nas condições controle e estresse térmico.....	54
FIGURA 6. Desenho experimental da visita principal (Estudo 2).....	68
FIGURA 7. Massa corporal total nas situações controle, desidratação leve, desidratação moderada e reidratação.....	72
FIGURA 8. Fluxo sanguíneo femoral em repouso e durante o exercício nas diferentes condições.....	74
FIGURA 9. Glutaciona reduzida (gsh) e oxidada (gssg) no sangue arterial e venoso.....	77
FIGURA 10. Atividade da superóxido dismutase no eritrócito no sangue arterial e venoso.....	78

FIGURA 11. Concentração de isoprostanos livres no plasma arterial e venoso em repouso e durante o exercício com diferentes níveis de desidratação e reidratação.....	79
FIGURA 12. Fluxo da glutathione reduzida na circulação. # diferente do controle exercício.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ACSM – Colégio Americano de Medicina do Esporte

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BHT - Hidroxitolueno butilado

BSO - L-butionina sulfoximina

Cl⁻ - Cloreto

Cu - Cobre

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTNB - 5,5'-ditios-2-ácido nitrobenzóico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

Fe⁺ - Ferro

GSH – Glutathiona, glutathiona reduzida

GSSG – Dissulfeto de glutathiona, glutathiona oxidada

GSH/GSSG – razão entre glutathiona reduzida e glutathiona oxidada

H⁺ - Íon hidrogênio

Hb - Hemoglobina

H₂O - Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

Htc – Hematócrito

K⁺ - Potássio

K2 EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético com sal de potássio

L• - Radical lipídico

M2VP - 1-metil-2-vinilpiridina trifluormetano-sulfonato

Na⁺ - Sódio

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO – Óxido nítrico

O₂ – Oxigênio

O₂^{•-} - Radical superóxido

OH[•] – Radical hidroxil

Pi – Fosfato inorgânico

SOD – Superóxido dismutase

SPSS – Statistical Package for Social Sciences

TCM - Temperatura corporal média

Tcoxa – Temperatura da coxa

Tpele – Temperatura da pele

Tpeito – Temperatura do peito

Tperna – Temperatura da perna

Tbraço – Temperatura do braço

Vmédia – Velocidade média do sangue

VO₂ – Consumo de oxigênio

VO₂max – Consumo máximo de oxigênio

1. CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A condição fisiológica da célula exige o equilíbrio entre moléculas pró e antioxidantes. O rompimento deste estado estacionário em favor da oxidação favorece o dano celular e essa condição é denominada estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2007) estando associado com o dano muscular e a fadiga induzida por exercício (Finaud et al. 2006). Está bem documentado que o exercício físico induz estresse oxidativo devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e redução da atividade de enzimas antioxidantes (Lovlin et al. 1987, Schneider et al. 2005, Pinho et al. 2010). As moléculas antioxidantes incluem agentes que cataliticamente removem as espécies reativas de oxigênio como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase bem como outras substâncias encontradas no plasma (ácido úrico, vitaminas, e outras, ver quadro 1 para maiores detalhes) as quais, em cooperação, promovem proteção contra o dano oxidativo (Yu, 1994). Estas enzimas podem ser afetadas pelo estresse térmico e pela desidratação (Ohtsuka et al. 1994, McAnulty et al. 2005, Morton et al. 2007, Paik et al. 2009).

Da mesma forma, é consenso que o exercício físico promove aumentos significativos na temperatura corporal (hipertermia) e que a regulação desta temperatura durante o exercício promove desidratação por meio da sudorese (Febbraio 2000, Maughan et al. 2007). Além disso, hipertermia e desidratação causam limitações cardiovasculares (Crandall & González-Alonso, 2010) e cognitivas (Racinais et al. 2008) resultando em queda no rendimento físico (Dougherty et al. 2006, Baker et al. 2007), principalmente quando a atividade é realizada em ambiente quente. O que não está claro, por outro lado, são as relações entre estresse oxidativo induzido pelo exercício, estresse térmico e desidratação uma vez que os estudos que tentaram relacionar tais variáveis apresentam algumas limitações, como não terem avaliado seres

humanos (Bernabucci et al. 2002, Mitchell et al. 1983, Oztürk et al. 2004), não terem controlado os níveis de desidratação (Ohtsuka et al. 1994, McAnulty et al. 2005, Morton et al. 2007), hipertermia (Ohtsuka et al. 1994, Paik et al. 2009) ou por não terem mensurado o estresse oxidativo durante o exercício (Mitchell et al. 1983, Morton et al. 2007, Ohtsuka et al. 1994). Outro aspecto interessante observado em tais estudos é que geralmente os marcadores de estresse oxidativo analisados na circulação são provenientes de amostras de sangue coletadas em vasos da região antecubital, sendo o local de coleta de sangue distante da musculatura ativa, dificultando a interpretação sobre os reais efeitos do exercício e ou da atividade muscular sobre o estresse oxidativo. Desta forma, amostras de sangue obtidas em vasos sanguíneos próximos da musculatura ativa podem refletir melhor o estresse oxidativo. Na presente tese foram realizados dois estudos originais considerando a problemática exposta nesta introdução.

2. CAPÍTULO II

REVISÃO DE LITERATURA

ESTRESSE TÉRMICO, DESIDRATAÇÃO E SUAS RELAÇÕES COM A
FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, DEFESA
ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO.

2.1 TEMPERATURA CORPORAL E EXERCÍCIO FÍSICO

A temperatura dos tecidos corporais é uma das qualidades dos mamíferos que precisa ser mantida ou fixada dentro de uma faixa compatível com a vida (Bernard 1865). Espécies endotérmicas, como a humana, evoluíram de seres que apresentavam a capacidade de produzir excesso de energia térmica durante os processos metabólicos, com taxas superiores a espécies co-existentes. Esta taxa de produção de calor é fortemente aumentada durante o esforço físico (Werner et al. 2008).

Durante o exercício físico, a produção de energia para regenerar ADP+Pi em ATP é proveniente da oxidação dos substratos energéticos e sua respectiva conversão de energia química em energia mecânica. Entretanto, 40 – 60 % da energia produzida pelas células resultam em calor. Grande parte do calor gerado metabolicamente é transferido para o centro do corpo promovendo aumentos na temperatura central. Este aumento é percebido por termorreceptores localizados no hipotálamo (Maughan et al. 2007). Esta área do sistema nervoso central recebe informação sensorial dos termorreceptores localizados na pele e integra estas informações para produzir as respostas efetoras apropriadas como o aumento do fluxo sanguíneo para a pele e o início da sudorese para aumentar a dissipação de calor e limitar aumentos na temperatura central (Jeukendrup & Gleeson, 2004). A efetividade das rotas de dissipação de calor (condução, radiação, respiração, convecção e evaporação) é fundamental para a manutenção da temperatura corporal. A evaporação do suor é o mecanismo mais eficiente para trocar calor com o ambiente durante exercícios realizados em ambiente terrestre (Shibasaki et al. 2006). A água que constitui o suor é proveniente do plasma sanguíneo com fluídos mobilizados dos compartimentos intracelulares para manter o volume de sangue circulante. Taxas elevadas de sudorese, tipicamente recorrentes da prática de exercícios em ambiente quente e úmido, podem levar a reduções progressivas no volume sanguíneo, volume de

ejeção e eventualmente limitar o fluxo sanguíneo para a musculatura ativa (Maughan et al. 2007) levando o sujeito de um estado de euhidratação (nível ideal de hidratação) para a desidratação.

As demandas do exercício físico em intensidades próximas ao consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) superam a demanda de fluxo sanguíneo (González-Alonso et al. 2008). O fluxo sanguíneo para a musculatura ativa (e para o miocárdio) é necessário para suprir as demandas energéticas musculares, principalmente as demandas de oxigênio, enquanto o fluxo sanguíneo periférico é necessário para suprir as demandas de regulação da temperatura, principalmente a produção de suor e transporte de calor do centro do corpo para a periferia (Crandall et al. 2010). Estas demandas combinadas de fluxo sanguíneo resultam em competição pelo débito cardíaco disponível (Rowell, 1974), o qual apresenta um limite em relação à capacidade de suprir a dupla demanda do exercício por si e a regulação da temperatura, particularmente durante o exercício aeróbio.

O fluxo sanguíneo reduzido para a musculatura ativa limita a duração do exercício, enquanto fluxo sanguíneo periférico reduzido resulta em limitada transferência de calor do centro para a periferia causando efeitos adversos da temperatura corporal elevada, incluindo a temperatura do sistema nervoso central (González-Alonso et al 2008). Os efeitos adversos da elevada temperatura corporal durante o exercício incluem inativação de enzimas, depleção acentuada de glicogênio muscular, aumento da frequência cardíaca resultando num maior esforço relativo por intensidade. Além destes fatores, a hipertermia está frequentemente associada com a desidratação, tornando difícil a análise da contribuição de cada uma (hipertermia, desidratação, ou ambas) sobre os efeitos supracitados.

2.1.1 MÉTODOS DE MEDIDA DA TEMPERATURA CORPORAL E ESTRESSE TÉRMICO

Encontram-se na literatura duas denominações para reportar o fenômeno de elevação da temperatura corporal: hipertermia e estresse térmico. A hipertermia consiste do aumento da temperatura central (retal, esofagiana e intestinal) igual ou maior do que 1°C (Febbraio 2000), enquanto estresse térmico refere-se ao aumento em conjunto das temperaturas da pele, muscular e central. Entretanto, apesar da clara diferença entre os termos, eles são freqüentemente utilizados de forma intercambiável na literatura. Nesta tese utilizamos os termos de acordo com a definição acima.

A temperatura central pode ser mensurada com o auxílio de termômetro de mercúrio, termopares ou termistores. O local clássico para a mensuração é o reto. Pelo fato da temperatura retal variar de acordo com a distância da entrada do esfíncter, geralmente essa medida é realizada de 5 a 10 cm da entrada do esfíncter. Esta temperatura retal é, em um indivíduo em repouso, um pouco mais alta do que a temperatura do sangue arterial e 0,2-0,5°C mais baixa do que a temperatura do cérebro onde o centro termorregulador está localizado. Durante o esforço físico ou exposição ao calor, a temperatura cerebral aumenta mais rapidamente do que a temperatura retal. O aumento ou diminuição da temperatura no reto e no cérebro são da mesma magnitude. A temperatura retal é, portanto apropriada para medir mudanças na temperatura central (Astrand et al. 2003).

A temperatura da pele é geralmente mensurada por meio da colocação de termopares em algumas regiões da superfície corporal (Buono et al. 2007). A temperatura média da pele é calculada por meio de fatores para cada medida em proporção a área de superfície corporal total representada por cada área específica, conforme sugerido originalmente por Hardy e Dubois (1937). Uma equação simples

para computar a temperatura média da pele a partir de observações de quatro áreas do corpo foi desenvolvida por Ramanathan (1964):

$$T_{pele} = (0,3 \times T_{peito}) + (0,3 \times T_{braço}) + (0,2 \times T_{coxa}) + (0,2 \times T_{perna})$$

O estresse térmico é extensamente usado na literatura para demonstrar a magnitude de aumento nas temperaturas central, da pele e média. Estudos que investigam as respostas fisiológicas ao estresse térmico passivo utilizam geralmente roupas de perfusão, nas quais água quente é perfundida pela roupa (González-Alonso et al. 2003; Davis et al. 2010), imersão do corpo inteiro ou apenas algum segmento (ex.: somente os membros inferiores) em tanques com água quente (Morton et al. 2007; Green et al. 2010) e por exposição do participante ao calor utilizando câmara ambiental (Selkirk et al. 2009; Greiner et al. 2010). Em todos os casos, o aumento na temperatura central é atingido por meio de aumento na temperatura da pele, apesar de haver diferenças na magnitude de aumento na temperatura dependendo da estratégia empregada. Alguns estudos reportam aumentos de apenas 0,5°C na temperatura central enquanto outros chegam a reportar aumentos de 2°C o que torna difícil a comparação entre estes estudos (Crandall et al. 2010).

2.1.2 DESIDRATAÇÃO E REIDRATAÇÃO

A euhidratação é a condição ideal de água total no corpo que varia dentro de ~0,5% da massa corporal (Institute of Medicine, 2005). Precauções devem ser tomadas quando ocorrem variações além deste intervalo fisiológico juntamente com queda funcional consistente. Chevront et al. (2003) propuseram que uma redução na massa corporal total maior do que 2% afeta negativamente o desempenho físico. Variações biológicas permitem que alguns indivíduos sejam mais ou menos tolerantes às conseqüências adversas da desidratação (Sawka & Noakes, 2007).

Em uma revisão de literatura sobre desidratação e rendimento físico foram descritos 28 estudos demonstrando que a desidratação afeta negativamente o rendimento físico. Esses resultados foram consistentes, apesar de apresentarem desenhos experimentais distintos, considerando os procedimentos para indução da desidratação e reidratação, tipos de exercício aeróbios e condições ambientais (Sawka & Noakes, 2007).

Durante a segunda guerra mundial (1939 – 1945), o exército norte-americano combateu no deserto em ambiente extremamente quente. Foi observado, durante esse período, que o consumo de líquidos influenciou a efetividade operacional dos combatentes. Tais observações estimularam o início de uma série de estudos em laboratório (Bean et al. 1943, Pitts et al. 1944) e de campo (Brown, 1947) que demonstraram que a desidratação afeta negativamente o rendimento aeróbio em ambientes quentes.

Os mecanismos fisiológicos envolvidos na queda de rendimento físico observada com a desidratação incluem: hipertermia (Cheuvront et al. 2004), sobrecarga cardiovascular (Montain et al. 1992, Montain et al. 1998), reduzido fluxo sanguíneo muscular (González-Alonso et al. 1998), metabolismo muscular alterado com uma maior utilização de glicogênio (Hargreaves et al. 1996), padrões eletromiográficos alterados (Bigard et al. 2001) e aumentada percepção de esforço durante o exercício (Montain et al. 1992). Apesar de todos estes efeitos, a desidratação não afeta a cinética do consumo de oxigênio (Nybo et al. 2001).

Diversos estudos demonstram que a ingestão de líquidos antes (pré-hidratação), durante e depois (reidratação) do exercício é uma estratégia eficiente para evitar os efeitos da desidratação (Carter et al. 1989, Hamilton et al. 1991, Coyle et al. 1992). O objetivo da pré-hidratação é garantir que haja um estado de euhidratação juntamente

com níveis adequados de eletrólitos plasmáticos. Se uma quantidade suficiente de líquidos for consumida com as refeições e se o repouso for adequado entre sessões de exercício extenuante (8 – 12h) o indivíduo deve estar muito próximo da euhidratação (Institute of Medicine, 2005). Quando necessária, a pré-hidratação com bebidas deve iniciar várias horas antes do início do exercício para garantir tempo de absorção intestinal e que os níveis de produção de urina retornem para índices normais (ACSM, 2007). A ingestão de líquidos durante o exercício, por outro lado, visa evitar a desidratação excessiva e alterações excessivas no balanço eletrolítico para evitar efeitos negativos sobre o desempenho. A quantidade e a taxa de reposição de líquidos dependem de fatores como a taxa de sudorese individual, duração do exercício e oportunidades para ingerir líquidos durante o exercício. Por fim, o objetivo da reidratação é repor os déficits de fluídos e eletrólitos corporais. Neste sentido, a presença de sódio na bebida ajudará no retorno a euhidratação enquanto a ausência de sódio estimulará a produção de urina e dificultará a reidratação (Nose et al. 1988, Maughan et al. 1995, Shirreffs et al. 1998). De acordo com o último posicionamento do Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) deve-se evitar ingerir mais líquidos do que a quantidade necessária para repor as perdas pelo suor (ACSM, 2007).

Considerando as sobrecargas impostas pelo estresse térmico e pela desidratação sobre vários sistemas fisiológicos, principalmente o sistema nervoso central (Racinais et al. 2008) e o sistema circulatório (Crandall et al. 2010), não surpreende que alterações na defesa antioxidante e formação de radicais livres possam ocorrer em humanos durante o exercício em condições de estresse térmico e/ou desidratação. Alguns estudos mostram alguma relação entre estresse térmico e desidratação com a formação de radicais livres em células isoladas ou em modelos animais (Mitchell et al. 1983; Bernabucci et al. 2002; Oztürk et al. 2004; Zhao et al. 2006) enquanto que outros

tentaram demonstrar essa relação em humanos (McAnulty et al. 2005, Paik et al. 2009). Entretanto, não está claro se há um efeito do estresse térmico, independente da desidratação, sobre a defesa antioxidante, balanço redox e lipo peroxidação em humanos durante o exercício.

2.1.3 MUDANÇAS NO VOLUME PLASMÁTICO E SANGUÍNEO DURANTE O EXERCÍCIO, ESTRESSE TÉRMICO E DESIDRATAÇÃO.

Uma dificuldade associada ao estudo de marcadores bioquímicos circulatórios em participantes hipertérmicos e/ou desidratados está relacionada às alterações que ocorrem no volume plasmático e sanguíneo durante tais intervenções (Dill & Costill, 1974; Kargotich et al. 1998). Na verdade, mesmo durante o exercício com ausência de hipertermia e desidratação, são observadas alterações significativas no volume plasmático e sanguíneo devido à passagem de líquido do meio intravascular para o espaço extravascular (Kargotich et al. 1998). Estas alterações, nos casos de exercício e/ou hipertermia, ocorrem devido ao aumento no fluxo sanguíneo muscular que causa alteração no equilíbrio entre forças de filtração e absorção que atuam nos capilares aumentando a pressão dos fluidos (Harrison, 1985) e, no caso da desidratação, devido à perda de líquidos via sudorese (Harrison, 1985). Outro fator que pode afetar as alterações no volume plasmático é a postura (Kargotich et al. 1998). González-Alonso et al. (1999) demonstraram que humanos desidratados que executaram exercícios em posições corporais diferentes, com intensidades similares, apresentaram respostas distintas em relação as reduções no volume plasmático quando executados em posição supina (10,2% de redução no volume plasmático) ou posição ereta (12,2% de redução no volume plasmático). Essa menor queda observada no volume plasmático na posição

supina foi suficiente para contrapor os efeitos deletérios da desidratação sobre o sistema cardiovascular ao aumentar o volume sanguíneo central.

O volume plasmático também é influenciado pela temperatura ambiente e o estresse térmico isolado pode levar a hemoconcentração (Myhre et al. 1977; Stephenson et al. 1988) ou a hemodiluição (Senay, 1970). Ambientes quentes aumentam a temperatura corporal central e promovem aumento do fluxo sanguíneo periférico via vasodilatação arteriolar (Kargotich et al. 1998). Isto resulta na abertura de mais capilares por meio do aumento da pressão hidrostática capilar, facilitando a perda de calor (Rendell et al. 1993). Este efeito isolado leva ao aumento da pressão hidrostática nos capilares que resulta no movimento de fluídos para o espaço extravascular (hemoconcentração) (Harrison et al. 1983).

O nível de hidratação pré-exercício pode influenciar nos ajustes dos fluídos corporais durante o exercício (Senay, 1978). A desidratação, isolada ou em combinação com o exercício, promove hemoconcentração devido a reduções no volume plasmático (Costill et al. 1974; Gaebelein et al. 1980). Gaebelein et al. (1980) demonstraram que os níveis de hemoglobina aumentaram em participantes euhidratados e desidratados que se exercitaram em esteira rolante por 60 minutos a 34% do VO_2 max. No entanto, o aumento na concentração de hemoglobina foi mais precoce no grupo desidratado demonstrando que a desidratação acentua a hemoconcentração. De acordo com Kargotich e colaboradores (1998), é importante considerar estas alterações ao reportar marcadores bioquímicos na circulação, visto que as alterações no volume plasmático podem alterar a concentração independente da condição (ex.: exercício, estresse térmico, estresse oxidativo). No entanto, não há como descartar um possível mecanismo de sinalização induzido por alterações no volume plasmático independente da correção dos resultados.

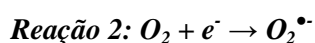
2.2 RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

Classicamente, níveis de oxigênio (O₂) superiores a 21% são conhecidos por causarem toxicidade em células aeróbias. Inicialmente, acreditava-se que tais efeitos estariam associados à inativação de enzimas essenciais. Entretanto, muitas enzimas não são afetadas pelo O₂. O principal causador da toxicidade do O₂ não é o O₂ por si, mas sim os radicais de O₂ que são formados a partir do mesmo. Um radical livre é qualquer molécula ou átomo capaz de existência independente (por isso o termo livre) que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular por si só (Halliwell & Gutteridge, 2006). A presença deste elétron desemparelhado causa a atração do radical livre por campo magnético e os torna muito reativos. A produção de radicais livres de O₂ é de ocorrência natural em humanos como resultado dos processos metabólicos oxidativos, muitas vezes sendo extremamente úteis como em situações como a ativação do sistema imunológico, a desintoxicação de drogas e produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos.

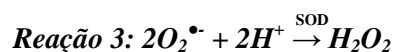
Do O₂ que respiramos aproximadamente 85-90% é utilizado pela mitocôndria na cadeia de transporte de elétrons, quando o O₂ é reduzido em H₂O ao aceitar quatro elétrons (reação 1) (Yu, 1994; Schneider & Oliveira, 2004).



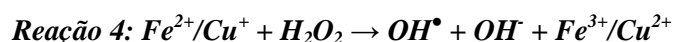
Devido a sua configuração eletrônica, o O₂ apresenta uma tendência a receber um elétron por vez. Desta forma, a adição de um elétron a uma molécula de O₂ em seu estado fundamental gera a formação do radical superóxido (O₂^{•-}) (reação 2).



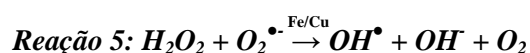
O $O_2^{\bullet-}$ ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio (H^+) forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio de um processo chamado dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em grandes quantidades em células de mamíferos e acelera a reação em 104 vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico.



Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, o radical hidroxil é formado (OH^{\bullet}) que é o mais reativo dos radicais, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos. O OH^{\bullet} pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre (reação 4). A reação é conhecida como Reação de Fenton.



Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, conduzindo à produção de radical hidroxil (reação 5), a chamada Reação de Haber-Weiss.



Os radicais superóxido e hidroxil têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa e são, portanto, chamados radicais livres. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre; no entanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido e, portanto é considerado uma espécie reativa de oxigênio. Outra espécie reativa de interesse é o oxigênio *singlet*, que é uma forma de oxigênio spin-alterado. Esses metabólitos derivados do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas (Yu, 1994), e em geral alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem. Além disso, o $O_2^{\bullet-}$ pode reagir diretamente com o óxido nítrico

(NO), um radical livre centrado no nitrogênio, gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil (reação 6).



2.2.1 ISOPROSTANOS COMO MARCADORES DE LIPOPEROXIDAÇÃO

Dentre os alvos susceptíveis ao dano induzido por radicais livres estão os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e organelas. As reações de peroxidação de lipídios são geralmente induzidas por participação do radical hidroxil, oxigênio molecular e ferro. A reação inicia-se por abstração de um hidrogênio do ácido graxo contendo dupla ligação, com formação do radical lipídico (L•) o qual reage com o oxigênio molecular. Em seguida ocorre a reação em cadeia e a formação de produtos de quebra (Sies, 1986). Os isoprostanos são membros da família de prostaglandinas que são formados a partir da modificação oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados via mecanismo catalizado por radical livre (Pratico et al. 2001). Os isoprostanos são gerados inicialmente no local de ataque dos radicais livres na membrana das células, mais especificamente no ácido araquidônico esterificado dos fosfolípidos, onde eles são clivados por fosfolipases. Posteriormente, os isoprostanos circulam no plasma e são eliminados pela urina (Stafforini et al. 2006).

A medida de isoprostanos livres em fluídos biológicos tem se tornado uma das medidas mais aceitas de peroxidação lipídica que ocorrem in vivo (Roberts et al. 2000). Este marcador tem sido muito utilizado por ser detectado no plasma e na urina por meio de técnicas bioquímicas cada vez mais acessíveis. As concentrações aumentadas de isoprostanos são observadas em uma série de condições patológicas como a aterosclerose, doença pulmonar e hepática, desordens neurológicas e diabetes (Pratico et

al. 2001, Pratico et al. 2004, Morrow, 2005). Mais recentemente esse marcador tem sido utilizado para a determinação do dano a lipídio induzido por exercício (Nieman et al. 2002, McAnulty et al. 2005). O aumento significativo na concentração plasmática após exercício exaustivo suporta que o exercício induz a formação de ERO (Nieman et al. 2002). Os isoprostanos, além de serem marcadores específicos de peroxidação lipídica, também participam da ativação inata do sistema imunológico, aumentam a agregação plaquetária, constrição da musculatura lisa e são encontrados nas placas ateroscleróticas (Morrow et al. 1997). Os efeitos fisiológicos agudos e crônicos de concentrações elevadas de isoprostanos durante o exercício ainda precisam ser determinadas. Por outro lado, apenas um estudo foi encontrado, até agora, determinando os efeitos da hipertermia induzida pelo exercício sobre as concentrações de hidroperóxidos lipídicos e isoprostanos no plasma (McAnulty et al. 2005). Neste estudo, os participantes realizaram duas visitas ao laboratório, numa das visitas (hipertermia) os participantes se exercitaram numa esteira com temperatura ambiente de 35°C e 70% de umidade relativa do ar. Os participantes foram continuamente monitorados até atingirem uma temperatura retal de 39,5°C e o tempo necessário para atingir este aumento foi registrado. Na sessão seguinte (controle), os participantes realizaram o mesmo tempo de exercício em intensidade semelhante atingidos na sessão anterior, porém as condições ambientais eram de 25°C e 40% de umidade relativa do ar. Coletas de sangue foram realizadas antes e depois dos protocolos bem como oito e 15 minutos após o encerramento do exercício. Os resultados demonstraram que os lipoperóxidos não sofreram alterações induzidas pelo exercício e nem pela hipertermia. Por outro lado houve um aumento significativo nas concentrações de isoprostanos e este aumento foi exacerbado na presença de hipertermia. No final do protocolo de hipertermia os participantes apresentavam reduções de ~3% na massa corporal total e, portanto,

estavam desidratados. Desta forma, não está claro se o aumento dos isoprostanos está associado a hipertermia, desidratação ou a combinação de ambos.

2.3 DEFESA ANTIOXIDANTE

Substâncias que neutralizam os potenciais efeitos danosos dos radicais livres são geralmente chamadas de antioxidantes e em conjunto constituem o sistema de defesa antioxidante (Yu, 1994). Os sistemas antioxidantes responsáveis pela proteção celular são tão diversificados quanto os radicais livres. Desta forma, existem muitas substâncias que desempenham papel antioxidante (ver quadro 1 maiores detalhes). Nesta revisão, priorizaremos as defesas antioxidantes que foram mensuradas nesta tese (SOD e GSH) bem como os efeitos do exercício, estresse térmico e desidratação sobre tais sistemas antioxidantes.

2.3.1 SUPERÓXIDO DISMUTASES (SODs)

A descoberta das SODs proporcionou um maior esclarecimento sobre o funcionamento das defesas antioxidantes. Existem três isoformas de SOD em mamíferos, sendo duas intracelulares, cobre-zinco (citoplasmática e nuclear) e manganês dependente (mitocondrial), e uma intracelular, cobre dependente (Powers et al. 2008). As enzimas SODs são altamente eficientes na remoção catalítica de $O_2^{\bullet-}$.

A defesa antioxidante mediada pela SOD é considerada primária, pois previne a geração de radicais livres mais reativos e está presente em todos os organismos aeróbios (Yu, 1994). Sua atividade catalítica foi descoberta por McCord e Fridovich (1969) e está associada à dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. A atividade da SOD no músculo esquelético não é constante e varia de acordo com o tipo de exercício. Embora alguns estudos sugiram que treinamento com

exercícios aeróbios não aumente a atividade da SOD (Alessio et al. 1988, Laughlin et al. 1990, Hellsten et al. 1996, Lambertucci et al. 2007), muitos estudos demonstram que este tipo de treinamento aumenta a atividade da SOD em 20 – 112% na musculatura ativa (Higuchi et al. 1985, Criswell et al. 1993, Leewenburgh et al. 1994, Powers et al. 1994, Oh-ishi et al. 1997, Vincent et al. 1999, Lawler et al. 2006). A razão para estes resultados conflitantes pode ser explicada pelas diferentes técnicas aplicadas para a dosagem da atividade enzimática.

Alguns estudos demonstram alteração da atividade da SOD induzida por aumento na temperatura corporal (Oztürk et al. 2004, Morrison et al. 2005). Morrison et al. (2005) determinaram as respostas da SOD hepática ao estresse térmico em ratos controle e em ratos que tiveram as reservas de glutathiona hepática depletadas por L-butionina sulfoximina (BSO) antes da exposição ao calor. A temperatura retal dos animais foi elevada a 41°C. Os resultados apontaram que o estresse térmico reduziu a atividade da SOD nos ratos tratados com BSO. Em outro estudo (Oztürk et al. 2004) a atividade da SOD foi determinada no eritrócito de ratos jovens e adultos expostos cronicamente ao calor. O estresse térmico diminuiu a atividade da SOD nos ratos jovens, mas aumentou a atividade da SOD em ratos adultos. O mecanismo associado a esta resposta da queda da atividade da SOD em ratos jovens não foi descrito, embora os autores sugiram que a enzima possa ter sido inativada pelo calor e pelo seu produto resultante, o H₂O₂. Bernabucci et al. (2002) demonstraram que o estresse térmico induziu estresse oxidativo em vacas. A atividade da SOD nos eritrócitos estava aumentada na condição de exposição ao calor. Entretanto, a maioria dos estudos avaliando as respostas do estresse oxidativo ao estresse térmico e desidratação em humanos durante o exercício, não avaliam a enzima SOD como um marcador de estresse oxidativo (McAnulty et al. 2005; Paik et al. 2009) sendo essa resposta em

humanos em tais condições desconhecidas. Por outro lado, Morton et al. (2007) não identificaram alterações na atividade da SOD no músculo esquelético de humanos que foram imersos em um tanque com água quente para elevar a temperatura central de 37,5°C para 39°C e temperatura muscular de 36°C para 39,5°C. Entretanto, as medidas foram realizadas após protocolo passivo (sem a realização de exercício) e a medida da SOD foi realizada somente 24 h após a exposição ao calor.

2.3.2 GLUTATIONA

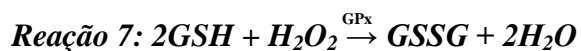
O controle da manutenção do ambiente redox intracelular é essencial para a função celular normal. O estresse oxidativo que é gerado pelas reações metabólicas, como a produção de energia mitocondrial e oxidação de toxinas pela citocromo P450, é dissipado pelo trabalho conjunto de antioxidantes que ajudam a tamponar o ambiente redox. A glutatona (GSH) é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina (γ -glutamilcisteinilglicina) e é vital para a função celular normal. Sua homeostase é modulada basicamente por duas enzimas: glutamato cisteína ligase, que catalisa o passo de biossíntese da GSH, e a γ -glutamyltranspeptidase, que inicia a correção da GSH. Pelo fato da GSH modular a sinalização celular de uma forma oxidação-dependente, é fundamental que a célula tenha formas eficientes de restabelecer os níveis reduzidos. Os níveis de GSH são mantidos pela glutatona redutase, um nucleotídeo com base de pirimidina que transfere elétrons da NADPH para oxidar a GSH (Barycki, 2008).

A GSH é encontrada em células eucariontes e 90% da concentração intracelular de GSH estão no citoplasma, sendo o restante espalhado em outras organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo. No entanto, a biossíntese de GSH parece acontecer exclusivamente no citosol. As concentrações estimadas de GSH vão de 0,5 a 10 mM em tipos diversos de célula, sendo a vasta maioria da GSH, a forma reduzida. A

forma oxidada de GSH, a GSSG, resulta da ligação de duas moléculas de GSH via ligação de dissulfeto. A razão de GSH para GSSG é frequentemente utilizada para expressar o estado redox celular. Tipicamente, a razão GSH/GSSG é >10:1 no citosol e mitocôndria e até 1:1 no retículo endoplasmático. A menor razão GSH/GSSG encontrada no retículo endoplasmático facilita a formação de ligação de dissulfetos durante a síntese de proteínas de membrana e secretórias (Barycki, 2008).

A GSH está envolvida em vários processos biológicos. Estas funções incluem o estoque e transporte de cisteína, leucotrienos e síntese de prostaglandinas, manutenção de estruturas e funções protéicas e regulação da atividade enzimática por meio da redução das ligações de dissulfeto ou pela glutationalização. Entretanto, sua função primária é a manutenção da homeostase redox intracelular, garantindo proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como xenobióticos eletrofilicos (Banerjee, 2008).

A proteção contra espécies reativas de oxigênio geradas como resultado do metabolismo aeróbio é largamente atingida pelo trabalho combinado de diversos sistemas enzimáticos. A superóxido dismutase, como discutido anteriormente, catalisa a conversão de duas moléculas de radical superóxido ($O^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. O H_2O_2 pode então ser convertido em água pela catalase, glutational peroxidase ou peroxiredoxinas. As glutational peroxidases constituem uma família de enzimas contendo seleniocisteína que podem converter H_2O_2 em água ou lipoperóxidos para seus alcoóis correspondentes com geração concomitante de GSSG (Reações 7 e 8).



Em condição celular normal, a glutational redutase pode manter uma elevada razão GSH/GSSG. No entanto, em caso de estresse oxidativo extremo, a GSSG pode ser

rapidamente exportada para ajudar a preservar a razão GSH/GSSG. Além disso, níveis elevados de GSSG podem levar a formação de misturas dissulfídicas entre a GSH e proteínas tiol, diminuindo, desta forma, os níveis de GSSG e protegendo as sulfidrilas livres nas proteínas. Desta forma a GSH pode ser considerada a via primária de defesa antioxidante preventiva que impede a formação e ação dos radicais livres.

Diversos estudos demonstram que o exercício físico induz estresse oxidativo e, portanto promove alterações no metabolismo da GSH. Lew et al. (1985) demonstraram que ratos que se exercitaram até a exaustão em esteira demonstraram aumentos nos níveis de GSH total e GSSG no plasma após o exercício e a razão GSH/GSSG diminuiu no plasma, fígado e no músculo esquelético dos ratos. Estudos subseqüentes também reportaram que os níveis de glutatona total hepática podem cair a níveis muito baixos após exercício intenso (Pyke et al. 1986). Tais estudos podem ser interpretados como indicativos de depleção do sistema antioxidante durante exercício submáximo prolongado que leva a exaustão. Gohil e colaboradores (1988) determinaram a resposta da GSH e GSSG após teste progressivo em ciclo ergômetro. Os resultados demonstraram que o exercício submáximo induziu oxidação de GSH no sangue de humanos e que a razão GSH/GSSG retornou para valores de repouso durante recuperação pós-exercício.

Um estudo recente (Veskoukis et al. 2009) demonstrou, em ratos, que as concentrações sanguíneas de GSH e GSSG apresentam forte correlação com as concentrações de ambos no músculo esquelético. Por outro lado, a razão GSH/GSSG não apresentou correlação entre o sangue e o músculo esquelético, a explicação para esse mecanismo não foi reportada. Entretanto, os autores sugerem que as medidas sanguíneas podem refletir as medidas intramusculares de GSH e GSSG e isto também

sugere que o músculo esquelético pode liberar GSH na circulação. Entretanto, as medidas não foram obtidas em humanos durante o exercício.

Considerando os efeitos do estresse térmico sobre o metabolismo da GSH, Ohtsuka e colaboradores (1994) mensuraram GSH total no eritrócito em humanos que foram imersos em água fria (29°C), morna (39°C) e quente (42°C) por 10 minutos. Apesar da temperatura central não ter sido reportada e o dissulfeto de glutathione não ter sido mensurado, foi encontrada uma redução significativa na GSH no eritrócito na situação com 42°C. Essa alteração foi acompanhada de redução na atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) nas condições morna e quente. Aparentemente, o estresse térmico induz oxidação da glutathione em repouso. Até o momento, o tecido com maior capacidade de liberar GSH é o hepatócito. No entanto, alguns estudos apontam que músculo esquelético também é uma fonte importante de GSH em condições de estresse severo como caquexia e depleção de glicogênio (Cotgreave et al. 2002, Veskokis et al. 2009).

QUADRO 1 – Sistemas antioxidantes. (Adaptado de Yu, 1994)

Categoria	Estrutura	Local	Ação
<i>Sistema Enzimático</i>			
Superóxido Dismutases	SOD Cu/Zn SOD Mn SOD Cu	Citosol/Núcleo Mitocôndria Plasma	Catalisam a dismutação de $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2
Catalase	Hemoproteína tetramérica	Peroxisomos	Catalisa a dismutação de H_2O_2 e redução de hidroperóxidos metil e etil
<i>Ciclo Redox GSH</i>			
GSH peroxidase	Selenioproteína	Citosol e mitocôndria	Catalisa a redução de H_2O_2 e outros hidroperóxidos (peróxidos lipídicos, produtos da lipoxigenase)
GSH Redutase	Proteína dimérica	Citosol e mitocôndria	Catalisa a redução de dissulfetos de baixo peso molecular
<i>Compostos Solúveis em Gordura</i>			
Vitamina E	Vitamina solúvel em gordura	Membranas lipídicas, fluidos extracelular	Converte $O_2^{\cdot -}$ em OH, e radicais peroxil lipídicos em formas menos reativas. Quebra a cadeia de reação de peroxidação lipídica.
β -caroteno	Precursor metabólico da vitamina A	Membrana de tecidos	Tampona o $O_2^{\cdot -}$ e reage diretamente com radicais peroxil
Bilirrubina	Produto do catabolismo da hemoproteína	Sangue e tecidos	Antioxidante quebrador de cadeia. Reage com ROO
<i>Compostos solúveis em água</i>			
Vitamina C	Vitamina solúvel em água	Distribuída nos líquidos intra e extracelular	Tampona diretamente o $O_2^{\cdot -}$ e OH^{\cdot} . Neutraliza oxidantes estimulado por neutrófilos. Contribui para a regeneração da vitamina E.
Ácido Úrico	Base de purina oxidada	Distribuída em todos os tecidos	Tampona $O_2^{\cdot -}$ e OH^{\cdot} , oxiheme peroxil. Previne a oxidação da vitamina C. Se liga a metais de transição
Cisteína	Aminoácido	Distribuído em todos os tecidos	Reduz vários compostos orgânicos ao doar elétrons de grupos de sulfidrilas
GSH	Tripeptídeo	Intracelular	Substrato para o ciclo redox. Reage diretamente $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} e reage diretamente com radicais livres orgânicos

3. CAPÍTULO III

OBJETIVOS

De acordo com o exposto no capítulo I, foram elaborados os seguintes objetivos:

Estudo 1: Verificar os efeitos separados e combinados do estresse térmico e exercício sobre marcadores circulatórios de estresse oxidativo em humanos eu hidratados.

Estudo 2: Verificar os efeitos da desidratação induzida pelo exercício e da subsequente reidratação sobre marcadores de estresse oxidativo na circulação venosa e arterial de humanos no repouso e durante o exercício.

CAPÍTULO IV

ARTIGO ORIGINAL

“EFEITOS COMBINADOS E SEPARADOS DO ESTRESSE TÉRMICO E
EXERCÍCIO SOBRE MARCADORES CIRCULATORIOS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM HUMANOS EUHIDRATADOS”

4.1 INTRODUÇÃO

A combinação entre exercício, estresse térmico e desidratação induz estresse severo em múltiplos sistemas regulatórios e fisiológicos (MacDougall et al. 1974; Kozlowski et al. 1985; González-Alonso et al. 1999; González-Alonso et al. 2008; Racinais et al. 2008) incluindo o equilíbrio entre agentes celulares oxidantes e antioxidantes (McAnulty et al. 2005; Paik et al. 2009) Um desequilíbrio entre agentes pró e antioxidantes em direção a um ambiente mais oxidativo é conhecido como estresse oxidativo e está associado ao dano e dor muscular durante o exercício (Finaud et al. 2006).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzida por estresse térmico pode ser um fator adicional que induz alterações moleculares no ácido desoxirribonucléico (DNA), proteínas, lipídios e outras moléculas biológicas que contribui para o estresse oxidativo (Bruskov et al. 2002; Grasso et al. 2003; Zhao et al. 2006). Diversos estudos tentaram determinar se o estresse térmico acentua o estresse oxidativo em seres humanos (McAnulty et al. 2005; Morton et al. 2007; Ohtsuka et al. 1994). Entretanto, os resultados de tais investigações não podem ser examinados somente no contexto do estresse térmico, pois os desenhos experimentais não controlaram os níveis de desidratação dos participantes. Em um estudo recente, que manipulou o estado de hidratação de indivíduos durante o exercício, foi demonstrado que a desidratação aumentou o dano oxidativo (Paik et al. 2009). Embora especulativo, o mecanismo por meio do qual a desidratação acentua o estresse oxidativo pode envolver alterações no estresse de cisalhamento causado por aumentos na viscosidade sanguínea (El-Sayed et al. 2005) e/ou reduzido fluxo sanguíneo periférico incluindo o fluxo sanguíneo para a musculatura ativa (González-Alonso et al. 1998). Além disso, o estudo de McAnulty e colaboradores (2005) demonstrou que a hipertermia (temperatura

retal de 39,5°C) acentuou o estresse oxidativo em humanos que se exercitaram numa esteira ergométrica por 50 minutos no calor, no entanto no final do protocolo os participantes apresentaram aproximadamente 3% de desidratação (medido pela redução na massa corporal total). Portanto, é difícil avaliar se o estresse térmico por si aumenta o estresse oxidativo durante o exercício. Por outro lado, Morton et al. (2007) encontraram que a temperatura central (38,9°C) e muscular (39,5°C) aumentadas não causaram estresse oxidativo em humanos no repouso. A disparidade de resultados pode ser devido a dificuldade de isolar o estresse térmico da desidratação, diferenças na magnitude de estresse térmico, desidratação e modelo experimental bem como diferenças nos marcadores de estresse oxidativo analisados.

Células aeróbias possuem dois tipos distintos de defesas antioxidantes, as enzimas preventivas e as enzimas de quebra de cadeia de radicais livres (Gohil et al. 1988). A enzima de quebra de cadeia de radical livre superóxido dismutase (SOD) cataliza a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e pode ajudar a recuperar após a exposição ao estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2006). No entanto, apesar de ser um importante mecanismo de defesa antioxidante em organismos aeróbios, pode ser afetado pelo aumento na temperatura corporal (Oztürk et al. 2004). A via antioxidante preventiva primária para a remoção de hidroperóxidos envolve a ação da enzima glutathione peroxidase que oxida a glutathione (GSH) a dissulfeto de glutathione (GSSG) no citosol e na mitocôndria (Jones, 2008). No entanto, no eritrócito humano, que não contém mitocôndria, estas enzimas antioxidantes estão presentes no citoplasma e trabalham em conjunto para remover hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (Inayama et al. 2002). Além disso, os eritrócitos são continuamente expostos a elevadas concentrações de oxigênio e ferro na hemoglobina e estes fatores tornam os eritrócitos sensíveis para estudar o dano oxidativo (Bernabucci

et al. 2002) tornando-os um modelo apropriado para estudar o estresse oxidativo (Kusmic et al. 2000). Recentemente, um estudo demonstrou que a GSH e a GSSG medidas nos eritrócitos se correlacionam bem com a concentração encontrada no músculo esquelético. Reduções na razão GSH/GSSG indicam estresse oxidativo induzido por não-radical, pois o estresse é causado pelo desequilíbrio redox ao invés de danos estruturais tais como peroxidação lipídica, dano a DNA e/ou proteína (Ferreira et al. 2008; Jones 2008). Outro marcador de estresse oxidativo induzido pelo exercício é a presença de isoprostanos resultantes da peroxidação de fosfolipídios induzida por radical livre e, portanto reflete a magnitude de peroxidação lipídica induzida por estresse oxidativo. Não obstante, os efeitos separados e combinados do estresse térmico isolado e em combinação com o exercício sobre estes marcadores circulatórios de estresse oxidativo em humanos euhidratados ainda não foram avaliados sistematicamente.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos do estresse térmico isolado e em combinação com o exercício sobre o estresse oxidativo em humanos euhidratados por meio da medida do metabolismo da glutatona em sangue total (GSH e GSSG), atividade da SOD no eritrócito e concentração de isoprostanos no plasma como marcadores de estresse oxidativo no repouso e durante uma sessão de extensão de joelho unilateral submáxima.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Participantes. Oito homens aparentemente saudáveis e fisicamente ativos (idade 26 ± 2 anos, estatura de $176 \pm 0,8$ cm e massa corporal total de $78,3 \pm 3$ kg) foram recrutados. Os participantes visitaram o laboratório em duas ocasiões. O

protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da *Brunel University* (ANEXO) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO) após terem sido informados sobre os riscos e benefícios envolvidos nos experimentos. Todos os procedimentos respeitaram as normas da Associação Médica sobre Ética (Declaração de Helsinki).

4.2.2 Visita Preliminar. Durante a primeira visita, a massa corporal total e a estatura foram mensuradas e uma sessão de familiarização foi realizada no ergômetro de extensão de joelho unilateral com uma carga leve de 5 W por 6 min. Logo após, os participantes realizaram um teste incremental no ergômetro de extensão de joelho unilateral até a exaustão para se determinar a intensidade da visita principal. A intensidade do exercício foi determinada para garantir que todos os participantes realizassem a mesma carga de trabalho relativa durante a sessão principal. A taxa de trabalho inicial foi de 10 W e aumentada em 10 W/min (numa cadência de 70 – 80 rpm) resultando em uma potência máxima de 50 ± 3 W. Os participantes não estavam realizando suplementação com antioxidantes e foram orientados a evitar atividade física intensa, ingestão de cafeína ou álcool por pelo menos 12 horas antes da visita principal e o consumo de antioxidantes uma semana antes do experimento.

4.2.3 Visita Principal. Na segunda visita, na chegada, os participantes auto-inseriram uma sonda retal que foi posicionada 10 cm além da passagem retal. Logo após, a massa corporal pré foi registrada (SECA Ltd, Birmingham, UK), termômetros de pele foram posicionados na superfície da pele em seis locais (peito, dorso superior, dorso inferior, abdômen, coxa e perna) e conectados a um sistema de aquisição de dados Squirrel Data Logger (Grant Instruments, Cambridge, UK) para determinar a

temperatura média da pele (Ramanathan 1964). A temperatura corporal média (TCM) foi estimada pela seguinte fórmula: $TCM = 0,8 \times T_{retal} + 0,2 \times T_{pele}$ (Hardy et al. 1937). Uma faixa telemétrica de frequência cardíaca (Polar Inc, Washington, NY) foi posicionada em volta do peito dos participantes. Os participantes vestiram uma roupa de perfusão entrelaçada a tubos de silicone e conectada a um circulador de água (Julabo F34, Seelbach, Alemanha). O circulador de água continha uma bomba auxiliar e uma unidade de controle de temperatura capaz de controlar a temperatura da água na roupa. A roupa cobria o corpo inteiro dos participantes exceto a cabeça, mãos e pés. Uma cânula foi inserida em uma veia da região antecubital enquanto os participantes repousavam por 15 minutos. Uma amostra de sangue (controle repouso) foi coletada antes dos participantes realizarem 6 minutos de extensão de joelho unilateral a 50% do pico de potência pré-determinado. Uma segunda amostra de sangue foi coletada no quinto minuto do exercício (controle exercício). Após 15 minutos de recuperação, água foi perfundida através da roupa a aproximadamente 48°C. Para minimizar a perda de calor durante o protocolo de estresse térmico o corpo foi coberto com papel laminado, meias cobriram os pés e uma touca de lã cobriu a cabeça. Os participantes realizaram um protocolo de estresse térmico passivo para elevar a temperatura retal e da pele em 1°C e 6°C respectivamente. Após atingir o aumento nas temperaturas (~75 minutos), uma amostra de sangue foi coletada (estresse térmico repouso) e os participantes realizaram uma segunda sessão de 6 minutos de extensão de joelho unilateral e outra amostra de sangue foi coletada após 5 minutos de exercício (estresse térmico exercício). Frequência cardíaca, temperatura retal e temperatura da pele foram registrados durante todo o protocolo. Para isolar os efeitos do estresse térmico (sem desidratação), os participantes foram mantidos euhidratados ao ingerirem ~1,5 l de água morna (~38°C) ao longo do protocolo de estresse térmico.



FIGURA 1 – Participante durante a visita principal no ergômetro de extensão de joelho unilateral vestindo a roupa de perfusão.

4.2.4 Preparação do Sangue. Amostras de sangue (10 ml) foram coletadas em uma seringa, dividida em cinco alíquotas de 2 ml em tubos com K2-EDTA e mantidos no gelo. Uma alíquota foi mantida como sangue total para posterior determinação da razão glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG). Para GSH, 50 μ l de sangue total foram adicionados a um microtubo e congelados para posterior análise. Para GSSG, 100 μ l de sangue total foram adicionados a um tubo eppendorf contendo 10 μ l de 1-metil-2-vinilpiridina trifluormetano-sulfonato (M2VP) para prevenir a participação da forma reduzida no ensaio enzimático sem inibir a atividade da glutathiona redutase, e imediatamente colocado em nitrogênio líquido. A alíquota remanescente do sangue total foi centrifugada a 1000 g por 10 minutos a 4°C para a separação do plasma. Um ml de plasma foi depositado em um microtubo contendo 10 μ l de 0,005% hidroxitolueno butilado (BHT) para posterior análise de isoprostanos. A camada que separa os eritrócitos do plasma contendo, principalmente, células sanguíneas brancas foi removida

e descartada. Uma alíquota de células vermelhas para a determinação de SOD foi lisada com 1:4 (v/v) de água ultra pura gelada e centrifugada a 10,000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (lisado de eritrócitos) foi removido e estocado para posterior determinação de atividade total de SOD no eritrócito. Os 2 ml remanescentes de sangue foram usados para analisar hemoglobina em duplicata usando o método de cianometahemoglobina e o hematócrito foi determinado em quadruplicata por microcentrifugação para estimar as alterações no volume plasmático como descrito por Dill & Costill (1974).

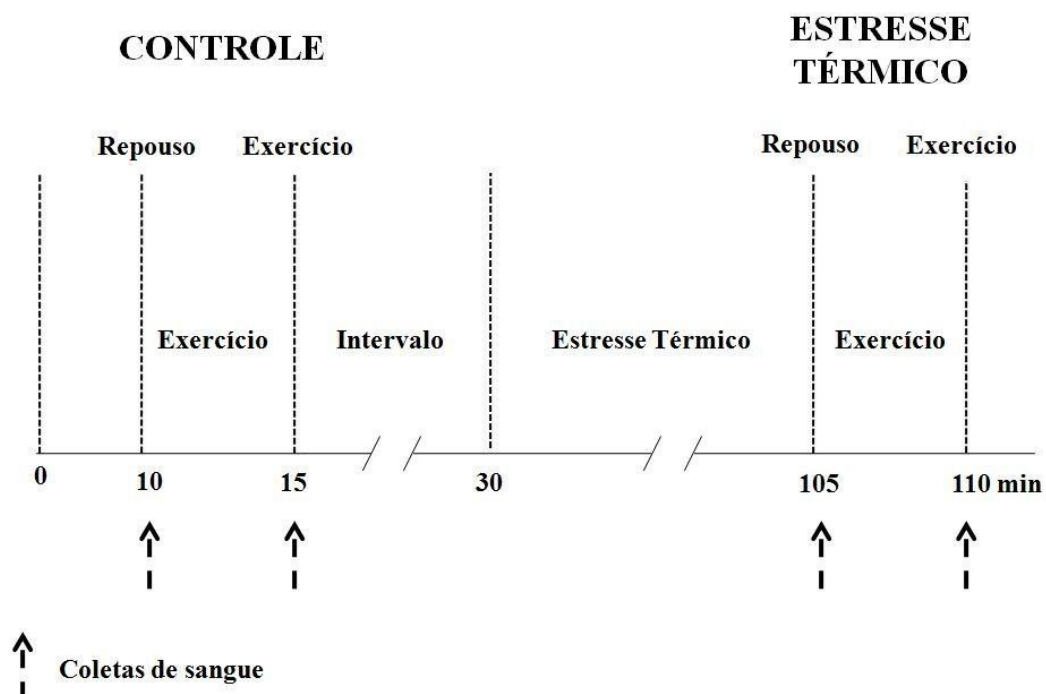


FIGURA 2 – Esquema experimental da visita principal.

4.2.5 Análise dos Marcadores de Estresse Oxidativo. A GSH foi determinada por meio de 5,5'-ditibios-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) que reage com a GSH para formar um produto espectrofotometricamente detectável a 412 nm (Calbiochem, Nottingham, UK). O kit comercial foi desenvolvido para a determinação de GSH e GSSG em sangue total. A GSSG foi determinada pela redução de GSSG a GSH usando

DTNB. A atividade da SOD foi mensurada por meio da sal tetrazolium para a detecção de radicais superóxidos gerados pela xantina oxidase e hipoxantina, a absorvância foi lida a 450 nm após um período de incubação de 20 minutos (Calbiochem, Nottingham, UK). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para exibir 50% de dismutação do radical superóxido. Os isoprostanos livres no plasma foram mensurados por um kit comercial de imunoensaio enzimático (Cayman Chemical, Estonia). Resumidamente, o ensaio é baseado na competição entre 8-isoprostanos e um conjugado de 8-isoprostanos-acetilcolinesterase para um número limitado de ligações específicas em anticorpo de ratos para 8-isoprostanos.

4.2.6 Análise estatística. A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Para identificar diferenças nos resultados com distribuição normal, análise de variância de dois caminhos para medidas repetidas foi empregada. Quando uma interação significativa foi aparente, as diferenças foram avaliadas pelo teste post-hoc de Tukey e teste t pareado com ajustes de Bonferroni para comparações múltiplas. Sempre que os dados foram não-paramétricos, as diferenças foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Os dados foram tratados usando SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Temperaturas e Estado de Hidratação. Na condição controle, a temperatura retal e da pele permaneceram inalteradas durante o exercício comparadas ao repouso (Tabela 1). Com o estresse térmico, a temperatura retal aumentou 1°C e a da pele aumentou em 6°C comparado ao controle repouso ($p < 0,05$) e permaneceram

inalteradas durante o exercício. Assim, a temperatura corporal média foi $1,9 - 2,0^{\circ}\text{C}$ mais alta durante o estresse térmico comparado as condições controle tanto em repouso quando durante o exercício. A massa corporal total não foi alterada durante o protocolo ($75,8 \pm 3,5$ vs. $75,8 \pm 3,5$ kg, $p = 0,736$). Embora o hematócrito ($p = 0,092$) e a hemoglobina ($p = 0,298$) não tenha sido afetados durante o protocolo, alterações estimadas no volume plasmático e volume sanguíneo foram detectadas (Tabela 1). O exercício isolado aumentou a frequência cardíaca em $29 \pm 5,5$ bpm ($p = 0,030$) enquanto o estresse térmico aumentou em $47 \pm 7,3$ bpm em repouso ($p < 0,001$) e $59 \pm 7,3$ bpm ($p < 0,001$) durante o exercício (Tabela 1).

4.3.2 Efeitos isolados do exercício. O exercício de extensão de joelho unilateral realizado sem estresse térmico não alterou a GSH nem a GSSG, como resultado a razão GSH/GSSG não foi alterada (repouso = 127 ± 32 ; exercício = 108 ± 27 , $p = 0,334$). A atividade da SOD no eritrócito (repouso = $0,0679 \pm 0,009$; exercício = $0,0811 \pm 0,009$ U/mL, $p = 0,208$) e a concentração de isoprostanos livre no plasma (repouso = $13,0 \pm 3,5$; exercício = $12,6 \pm 3,4$ pg/mL, $p = 0,674$) também permaneceram inalterados. O volume plasmático e volume sanguíneo não foram afetados pelo exercício isolado ($p < 0,05$) (Tabela 1).

TABELA 1. Hemodinâmica, temperaturas e massa corporal nas duas condições experimentais no repouso e durante o exercício.

	Controle		Estresse Térmico	
	Repouso	Exercício	Controle	Exercício
FC (bpm)	57.6 ± 3.8	86.4 ± 5.5#	104.8 ± 7.3#	145.8 ± 7.3*
Htc (%)	42.4 ± 0.7	42.9 ± 0.7	43.5 ± 0.7	44.8 ± 0.6
Hb (g/dl)	13.9 ± 0.2	14.3 ± 0.4	14.8 ± 0.1	14.8 ± 0.3
ΔVolume Plasmático (%)	0 ± 0	-3.4 ± 1.7	-7.9 ± 1.7#	-9.8 ± 1.6#*
ΔVolume Sanguíneo (%)	0 ± 0	-2.4 ± 1.4	-5.9 ± 1.4#	-5.8 ± 1.0#
Temperatura da Pele (°C)	33.1 ± 0.5	33.1 ± 0.5	39.0 ± 0.3#*	38.7 ± 0.3#*
Temperatura Retal (°C)	37.0 ± 0.1	37.0 ± 0.1	38.1 ± 0.1#*	38.3 ± 0.2#*
Temperatura Média (°C)	36.3 ± 0.1	36.3 ± 0.1	38.2 ± 0.1#*	38.3 ± 0.2#*
Massa Corporal (kg)	75.8 ± 3.5	-	-	75.8 ± 3.5

Frequência cardíaca (FC), hematócrito (Htc), hemoglobina (Hb), volume plasmático e sanguíneo em repouso e durante o exercício nas condições controle e com estresse térmico. Os valores de exercício foram registrados no quinto minuto após o início do exercício de extensão de joelho unilateral. Valores expressos em média ± erro padrão para oito participantes. # Diferente do controle repouso. *Diferente do controle exercício. P < 0,05.

4.3.3 Efeitos isolados do estresse térmico. Em repouso, o estresse térmico não alterou a GSH (620 ± 109 vs. 693 ± 143 μM, p = 0,093), mas aumentou a GSSG (5,7 ±

1,3 vs. $12,3 \pm 3,2 \mu\text{M}$, $p = 0,012$ comparado ao controle repouso), desta forma levando a uma redução significativa na razão GSH/GSSG ($127 \pm 31,6$ vs. $64 \pm 19,2$, $p = 0,017$). Nem a atividade da SOD no eritrócito ($0,068 \pm 0,009$ vs. $0,076 \pm 0,006$ U/mL, $p = 0,205$) nem a concentração de isoprostanos livres no plasma ($13 \pm 3,5$ vs. $14,4 \pm 3,9$ pg/mL, $p = 0,161$) foram afetadas pelo estresse térmico em repouso. O estresse térmico isolado induziu reduções no volume plasmático e sanguíneo ($p < 0,05$) quando comparado ao controle repouso, mas não foram diferentes do controle exercício ($p > 0,05$) (Tabela 1).

4.3.4 Efeitos combinados do estresse térmico e exercício. Quando combinado com o exercício, o estresse térmico aumentou tanto a GSH (569 ± 118 vs. $821 \pm 166 \mu\text{M}$, $p = 0,036$) quando a GSSG ($6 \pm 1,1$ vs. $16 \pm 6,6 \mu\text{M}$, $p = 0,012$) comparado ao controle exercício. Conseqüentemente, a razão GSH/GSSG não alterou (108 ± 27 vs. 88 ± 25 , $p = 0,208$) (Figura 1). A atividade da SOD no eritrócito diminuiu durante o exercício com estresse térmico ($0,081 \pm 0,009$ vs. $0,070 \pm 0,007$, $p = 0,036$) (Figura 2) enquanto a concentração de isoprostanos livres no plasma não alterou ($12,5 \pm 3,4$ vs. $15 \pm 3,7$ pg/mL, $p = 0,327$). A combinação de estresse térmico com exercício também induziu reduções no volume plasmático quando comparado ao controle repouso e exercício ($p < 0,05$). Reduções no volume de sangue foram apenas diferentes do controle repouso ($p < 0,05$) quando o estresse térmico e o exercício foram combinados (Tabela 1).

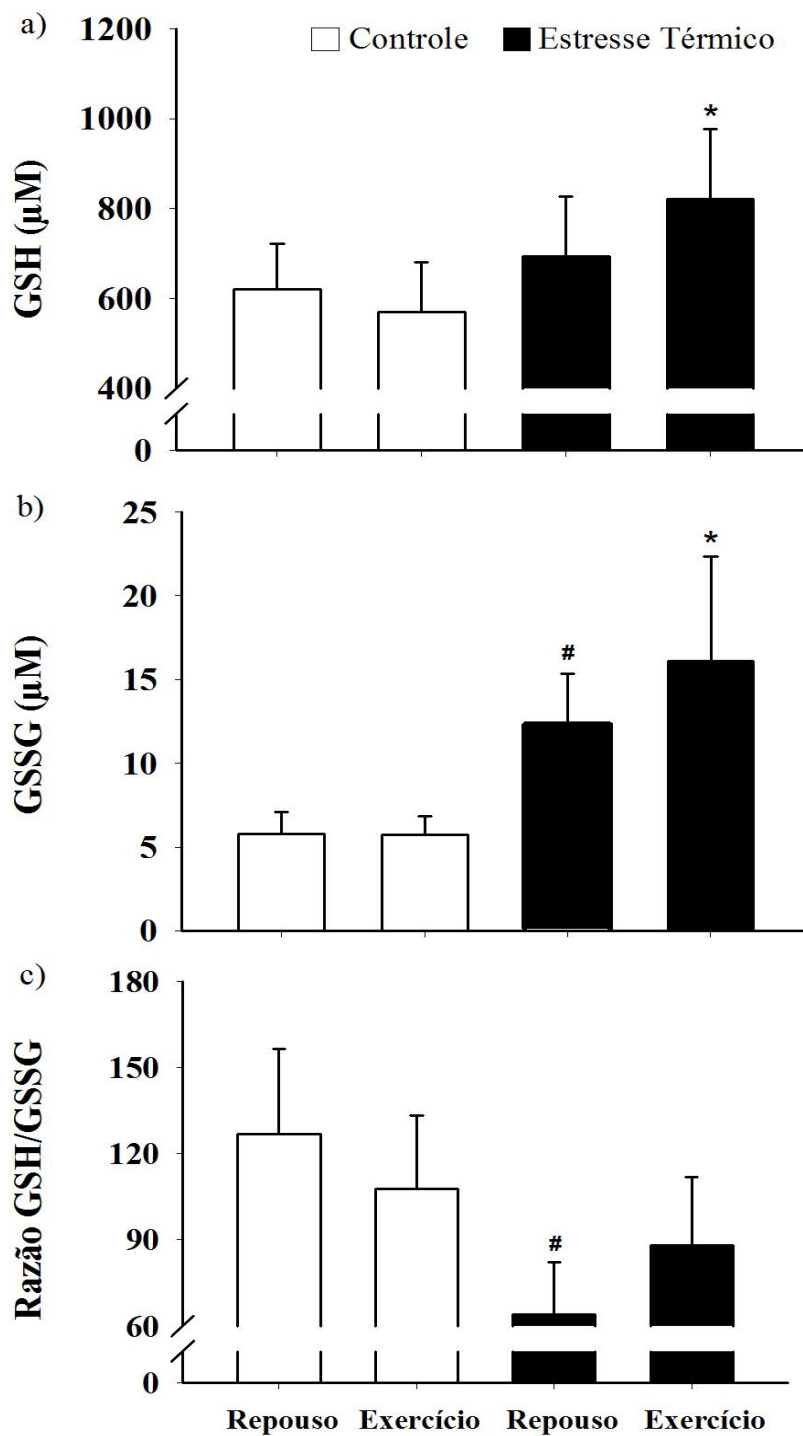


FIGURA 3. Efeitos do estresse térmico sobre glutathiona reduzida (a), oxidada (b) e razão gsh/gssg (c). # Diferente do controle repouso. *Diferente do controle exercício

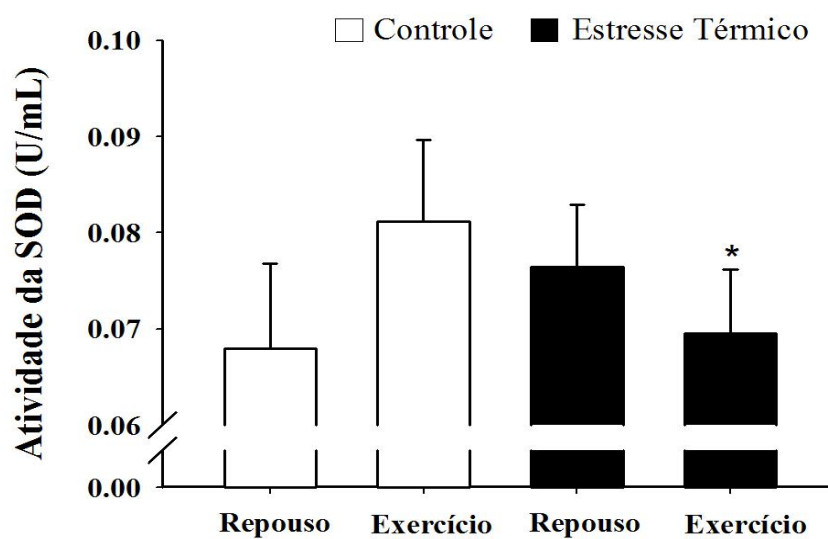


FIGURA 4. Atividade da superóxido dismutase no eritrócito em repouso e durante o exercício nas condições controle e estresse térmico. * Diferente do controle exercício, $P < 0,05$.

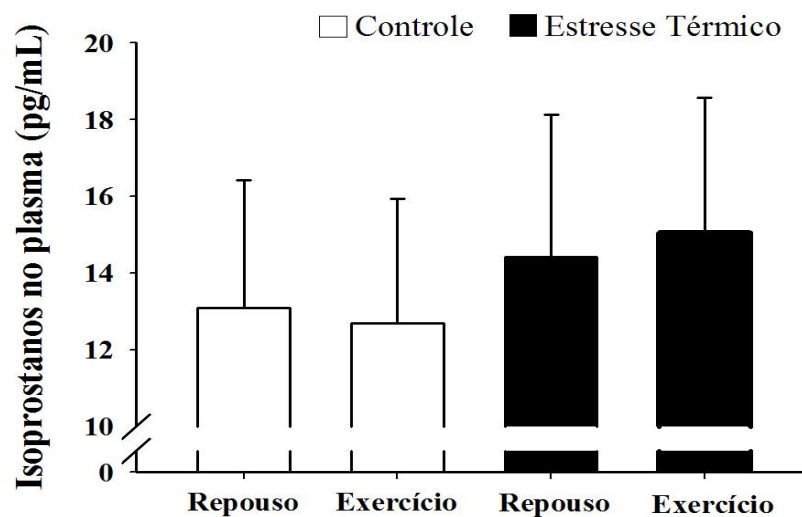


FIGURA 5. Plasma isoprostanos em repouso e durante o exercício nas condições controle e estresse térmico.

4.4 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi que o estresse térmico, independente da desidratação, induziu estresse oxidativo não-radical em repouso, mas não durante o exercício de intensidade moderada e massa muscular isolada, pois um aumento paralelo na defesa antioxidante compensou o estresse oxidativo induzido por estresse térmico. Para o nosso conhecimento este é o primeiro estudo que mediu os efeitos do estresse térmico, independente de desidratação, sobre marcadores circulatórios de estresse oxidativo em humanos no repouso e durante o exercício. Estudos prévios reportaram os efeitos do estresse térmico sobre o estresse oxidativo em modelo animal (Mitchell et al. 1983; Bernabucci et al. 2002; Oztürk et al. 2004; Zhao et al. 2006). No entanto, os estudos que determinaram estes efeitos em seres humanos apresentaram o efeito concomitante da desidratação (Ohtsuka et al. 1994; McAnulty et al. 2005) ou não mediram o estresse oxidativo durante o exercício (Ohtsuka et al. 1994; Morton et al. 2007).

O estado redox presente nas células tem sido sugerido como um componente importante na expressão gênica, função celular, e uma alteração crônica deste balanço a favor de um ambiente mais oxidado é associada a estresse oxidativo induzido por não-radical (Fisher-Wellman et al. 2009; Jones 2008). A GSSG acumula como resultado da oxidação de GSH devido a remoção de hidroperóxidos pela atividade da enzima glutathione peroxidase (Gohil et al. 1988). No presente estudo, o estresse térmico aumentou a GSSG sanguínea tanto em repouso quanto durante o exercício. Uma possível explicação para o aumento na GSSG em repouso poderia ser a acentuada auto oxidação de catecolaminas, pois o estresse térmico está associado a um aumento da liberação de noradrenalina na circulação (González-Alonso et al. 2003) e sua oxidação pode formar radicais livres (Supinski et al. 1996). Em contraste, o exercício também

está relacionado com um aumento na liberação de catecolamina (Bailey et al. 2004) mas o exercício isolado no presente estudo não causou oxidação de GSH. Um estudo que utilizou o exercício de extensão de joelho unilateral a 70% do pico de potência resultou em uma concentração de noradrelina de 2,73 nmol/l (Bailey et al. 2004) enquanto o estresse térmico em repouso em outro estudo resultou numa concentração de 5,4 nmol/l (González-Alonso et al. 2003). É possível especular que o tipo de exercício (extensão isolada de joelho) e a intensidade (50% do pico de potência) não tenham sido suficientes para induzir liberação significativa de catecolaminas com ausência de estresse térmico e, portanto a oxidação de GSH não foi observada. Além disso, durante o exercício, nossos resultados corroboram com outros estudos que demonstraram que a combinação de exercício submáximo e estresse térmico induzem a oxidação de GSH (Gohil et al 1988; Inayama et al. 2002; Ohtsuka et al. 1994).

Considerando a GSH, o estresse térmico não afetou a concentração sanguínea de GSH em repouso, mas aumentou a concentração de GSH durante o exercício. Um aumento na concentração de GSH é associado a uma maior defesa antioxidante preventiva uma vez que este tripeptídeo serve como substrato para a enzima glutathione peroxidase para remover hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (Halliwell & Gutteridge 2006). Evidência para essa afirmação é fornecida por um estudo sobre estresse térmico em humanos, no qual os participantes que foram imersos em uma banheira quente (42°C) apresentaram estresse oxidativo ao aumentar a concentração de GSH e a atividade da glutathione peroxidase (Ohtsuka et al. 1994). No entanto, no estudo supracitado não foi realizado exercício e a temperatura central não foi reportada. Desta forma, o mecanismo pelo qual a combinação de exercício e estresse térmico aumenta a concentração de GSH permanece sem uma explicação definida. Entretanto, é possível que o exercício realizado com elevadas temperaturas corporais aumentaria a atividade

da enzima glutathione redutase contribuindo assim para a formação aumentada de GSH pela inter conversão entre GSH e GSSG para conferir proteção termal transitória (Mitchell et al. 1983). Da mesma forma, outra possível explicação poderia ser o transporte inter órgãos de GSH uma vez que este tripeptídeo é sabidamente exportado em grandes quantidades pelo fígado e liberado no sangue durante o estresse oxidativo onde ele é transportado pelos eritrócitos (Meister 1988). Órgãos que utilizam a GSH tal como o fígado quebram a GSH por uma reação de γ -glutamyl transpeptidase e transportam os aminoácidos precursores nas células para ressíntese de GSH (Ji et al. 1992) resultando em uma concentração aumentada de GSH.

O protocolo de exercício isolado (ex.: sem estresse térmico) não afetou o balanço redox. Existe uma escassez de estudos reportando os efeitos do exercício de extensão de joelho unilateral sobre o metabolismo da GSH e podem existir dúvidas sobre a validade deste modelo para o estudo do estresse oxidativo. No entanto, um estudo (Bailey et al. 2004) utilizou o exercício de extensão de joelho unilateral e mediu adutos de radicais livres usando a técnica de “*spin trap*”. Embora eles tenham encontrado que o exercício de extensão de joelho unilateral acentuou a formação de radicais livres, não foi mensurado o metabolismo da GSH. Portanto, parece que embora ocorra a formação de radicais livres de forma aguda durante este tipo de exercício, o balanço redox permanece inalterado pelo menos quando o estresse térmico está ausente. O exercício de extensão de joelho unilateral utiliza o quadríceps que é um grande grupo muscular capaz de induzir elevações significativas na demanda cardiovascular (Andersen et al. 1985). No presente estudo, a frequência cardíaca foi elevada em aproximadamente 30 bpm com o exercício isolado e em 40 bpm quando o estresse térmico foi combinado com o exercício. Esta magnitude de aumento na frequência cardíaca corresponde a 75% da frequência cardíaca máxima predita e esta intensidade é

comparável a um exercício de intensidade moderada. Um modelo de exercício mais intenso (ex.: corrida em esteira ou pedalada intensa) poderia ter sido empregado ao invés do exercício de extensão de joelho unilateral. No entanto, para o presente modelo experimental, no qual os participantes realizaram ambas as condições no mesmo dia, um modelo de exercício mais intenso teria causado considerável efeito residual entre as condições controle e estresse térmico. Além disso, existem muitos estudos demonstrando as respostas oxidativas a tipos de exercício mais intenso sobre o estresse oxidativo, enquanto apenas poucos estudos utilizaram exercícios de intensidade moderada. Portanto, isto reforça um achado interessante do presente estudo, pois mesmo com a moderada intensidade e curta duração do exercício realizado, quando o estresse térmico foi sobreposto, alterações importantes no estado antioxidante foram observadas e evitou o desequilíbrio redox induzido por estresse térmico.

De acordo com os resultados do presente estudo, o estresse térmico diminuiu a razão GSH/GSSG em repouso, mas não durante o exercício. Reduções na razão GSH/GSSG indicam estresse oxidativo induzido por não-radical, pois o estresse é causado por desequilíbrio redox ao invés de danos estruturais como peroxidação lipídica, dano a proteína e/ou DNA (Ferreira et al. 2008; Jones 2008) o que corrobora com os achados do presente estudo, quando não foram observadas alterações nas concentrações plasmáticas de isoprostanos livres. Não obstante, durante o exercício, o músculo esquelético é a principal fonte formadora de radicais livres (Bailey et al. 2004) e portanto a medida do estresse oxidativo dentro da célula muscular forneceria um quadro mais sensível sobre o balanço redox intramuscular. No entanto, no presente estudo a GSH e a GSSG foram mensuradas no sangue total. Como a quantidade GSH e GSSG no plasma é muito baixa (Gohil et al. 1988) os resultados descritos no presente estudo são em sua predominância provenientes dos eritrócitos e demonstram ser

fortemente correlacionados com o balanço redox do músculo esquelético (Veskoukis et al. 2009). Por outro lado, no estudo de Veskoukis et al (2009), esta correlação não foi testada em humanos durante o exercício e os resultados demonstraram que as concentrações de GSH e a GSSG no sangue se correlacionam bem com o conteúdo muscular esquelético dos respectivos peptídeos, mas a razão GSH/GSSG não apresentou forte correlação e a explicação para este resultado surpreendente não foi fornecida. Por tanto, um estudo com técnicas mais invasivas, incluindo biópsia muscular, teria que ser realizado para certificar essa relação.

Para garantir que os presentes resultados de GSH e GSSG não foram afetados por efeito residual do exercício realizado na condição controle, em uma ocasião separada, dois participantes realizaram um protocolo para determinar o comportamento da GSH e GSSG ao longo do tempo em resposta a uma sessão de exercício de extensão de joelho unilateral, quando amostras de sangue foram coletadas antes do exercício, no quinto minuto do exercício de extensão de joelho unilateral e após o exercício aos 15, 30 e a cada 30 minutos por 2 horas seguidas por 60 minutos até 4 horas de recuperação passiva. Os resultados demonstraram que houve uma pequena diminuição nas concentrações de GSH e um aumento na GSSG durante os primeiros 15 minutos de recuperação e retornou aos valores de repouso 30 minutos após o exercício e permaneceu constante pelas próximas 3,5 horas. Considerando que a condição estresse térmico foi realizada 90 minutos após a sessão controle, é razoável concluir que as alterações no metabolismo da glutatona observadas no presente estudo foram principalmente resultado do estresse térmico ao invés de efeito residual do exercício na condição controle.

Embora a massa corporal tenha sido sensivelmente controlada por meio da oferta de água durante o experimento, resultando em manutenção do hematócrito e da

hemoglobina, reduções no volume plasmático foram observadas como resultado do estresse térmico isolado e em combinação com o exercício. Estas reduções nos fluidos intravasculares são, provavelmente, o resultado da passagem de líquido para os compartimentos intersticial e intracelular, devido ao exercício, bem como a ingestão de água durante a exposição ao estresse térmico. Corroborando com isso, foi observado em um estudo paralelo de nosso laboratório (dados ainda não publicados) que o volume plasmático e volume sanguíneo foram mantidos quando os participantes ingeriram solução contendo carboidratos e eletrólitos durante o protocolo de estresse térmico. Nós escolhemos não usar solução com carboidratos e eletrólitos no presente estudo, pois foi demonstrado que este tipo de solução afeta a defesa antioxidante e, portanto poderia ter um impacto sobre os resultados do presente estudo (Fernández et al. 2009). Embora um estudo determinando os efeitos do estresse térmico isolado e em combinação com o exercício sobre o estresse oxidativo em humanos mantidos euhidratados ao ingerirem solução isotônica sem carboidratos seja necessário, as estimativas indicam que as reduções no volume plasmático no presente estudo contabilizaram apenas uma pequena parte (~10%) do aumento observado nas concentrações de GSH e GSSG, portanto não alterando as conclusões do estudo. No entanto, a redução do volume plasmático pode estar envolvida no mecanismo de sinalização para o aumento da GSSG. Estudos futuros verificando este possível mecanismo são necessários.

Os resultados do presente estudo sugerem que o estresse térmico não altera a atividade da SOD no eritrócito em repouso, mas reduziu a atividade da SOD durante o exercício. A ativação da SOD é geralmente causada pelo aumento na formação de radical superóxido (Ji 1993). A SOD é uma enzima de quebra de cadeia de radical que catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell et al. 1993) e, além de ser um importante mecanismo de defesa

antioxidante em organismos aeróbios, pode ser afetada por mudanças na temperatura, como demonstrado por estudos prévios em modelo animal (Oztürk et al. 2004; Morrison et al. 2005). No presente estudo, a queda na atividade da SOD quando o estresse térmico foi sobreposto ao exercício reflete uma queda na defesa antioxidante de quebra de cadeia de radical livre devido à inativação da atividade da SOD induzida pela combinação de estresse térmico e exercício. Com o exercício isolado houve uma tendência de aumento na atividade da SOD, embora não tenha sido estatisticamente significativa em função da grande variabilidade inter sujeitos na sessão controle, como resultado a redução na atividade da SOD observada com a combinação de exercício e estresse térmico foi provavelmente uma atenuação no aumento da atividade enzimática induzida pelo exercício. No entanto, o mecanismo preciso pelo qual a atividade da SOD é atenuada pelo estresse térmico durante o exercício em humanos euhidratados submetidos ao estresse térmico necessita de investigação futura.

No presente estudo, a concentração de isoprostanos livre no plasma não foi afetada pelo estresse térmico tanto em repouso quanto durante o exercício. Entretanto, um estudo prévio reportou aumento na concentração de isoprostanos no plasma em humanos que se exercitaram em esteira (50% VO_{2max}) no calor (McAnulty et al. 2005). A razão para este resultado conflitante pode ser o tipo de exercício, o estado de hidratação e o grau de aumento na temperatura central observada nos estudos. Também, a maior defesa antioxidante preventiva proporcionada pelo aumento observado na GSH quando o estresse térmico e o exercício foram sobrepostos pode ter protegido as células da peroxidação lipídica resultando, portanto em concentrações inalteradas de isoprostanos.

Em conclusão, este estudo demonstrou que o estresse térmico isolado, independente de desidratação, induziu estresse oxidativo não-radical em repouso, mas

não durante o exercício moderado de curta duração, pois um aumento na GSH compensa o estresse oxidativo induzido por hipertermia em humanos euhidratados. Estes achados implicam que o estresse térmico isolado pode ser um estímulo para o estresse oxidativo em repouso, enquanto que em combinação com o exercício moderado de curta duração, acentua a defesa antioxidante, evitando o desequilíbrio redox e provavelmente prevenindo o dano estrutural.

5. CAPÍTULO V

ARTIGO ORIGINAL

“EFEITOS DA DESIDRATAÇÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO E REIDRATAÇÃO SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA CIRCULAÇÃO EM REPOUSO E DURANTE O EXERCÍCIO”

5.1 INTRODUÇÃO

É consenso que o exercício físico acentua a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Finaud et al. 2006). A condição fisiológica celular exige o equilíbrio entre a produção de ERO e a defesa antioxidante. O rompimento deste estado estacionário em favor da oxidação favorece o dano celular e essa condição é denominada estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2007) que pode estar associado à fadiga e ao dano muscular (Jones, 2008). Da mesma forma, o exercício físico induz desidratação se a quantidade de líquidos perdida via sudorese não for repostada durante o exercício. Uma redução de apenas 2% na massa corporal está relacionada com limitada função fisiológica e rendimento físico (Armstrong et al. 1985, González-Alonso et al. 1997, Bachle et al. 2001). Até o momento, poucos estudos foram realizados examinando diretamente os efeitos da desidratação sobre o estresse oxidativo em humanos e estes estudos sugerem que a desidratação induz estresse oxidativo (McAnulty et al. 2005; Paik et al. 2009). Embora o mecanismo associado a este fenômeno ainda não tenha sido esclarecido, uma possibilidade é o envolvimento de alterações no estresse de cisalhamento pelo aumento da viscosidade sanguínea (El Sayed et al. 2005) e/ou redução do fluxo sanguíneo periférico incluindo o fluxo para o músculo esquelético (González-Alonso et al. 1998). Estudos demonstram que a reidratação, por outro lado, tem efeito positivo sobre o rendimento físico, pois elimina os efeitos negativos da desidratação (Below et al. 1995) e contribui para a redução do estresse oxidativo durante a recuperação de uma sessão de exercício (Paik et al. 2009). Entretanto, a reidratação realizada com bebidas contendo carboidrato e eletrólitos, apesar de serem recomendadas, pode causar estresse oxidativo devido a presença de frutose (Fernandez et al. 2009).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina (γ glutamylcysteinylglycine) que está presente em diversos tecidos e é vital para a função celular normal (Banerjee et al. 2008). A GSH é um importante componente da defesa antioxidante, sendo a rota primária para a prevenção de dano oxidativo induzido por hidroperóxido que ocorre durante o estresse oxidativo (Gohil et al. 1988). Como durante o exercício a produção de ERO pelo músculo esquelético é aumentada (Reid et al. 1992), a defesa antioxidante é fundamental para evitar o estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2006). Um aspecto pouco estudado, considerando os efeitos do exercício sobre a GSH, é o fluxo deste tripeptídeo durante o exercício (Hellsten et al. 2001). Além disso, nenhum estudo determinou o fluxo de GSH durante condições mais extremas de exercício como a desidratação. Estudos têm sugerido que o principal tecido capaz de liberar GSH na circulação in vivo é o tecido hepático (Burk et al. 1995). O hepatócito exporta GSH em grandes quantidades e libera GSH na corrente sanguínea, na qual o tripeptídeo é transportado pelos eritrócitos (Meister, 1988). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o músculo esquelético auxilia o fígado a manter as concentrações sistêmicas de GSH quando necessário (Burk et al. 1995; Cotgreave et al. 2002). Um estudo demonstrou que existe forte correlação entre o conteúdo muscular esquelético de GSH e dissulfeto de glutathiona (GSSG) e as respectivas concentrações sanguíneas em ratos (Veskoukis et al. 2009). Embora esta correlação não tenha sido testada em humanos durante o exercício, esta evidência sugere que o conteúdo muscular de GSH pode ser regulado de acordo com a concentração de GSH na circulação. O único estudo que testou esta hipótese em humanos durante o exercício não encontrou evidências tanto de liberação quanto de consumo de GSH total no plasma (Hellsten et al. 2001). No entanto, como a maior quantidade de GSH sanguínea encontra-se nos

eritrócitos (Gohil et al. 1988) a medida realizada somente no plasma pode limitar a interpretação.

Outra molécula com importante papel antioxidante é a enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e contribui na recuperação após exposição ao estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2006). O estresse oxidativo resulta em dano a diversas estruturas celulares incluindo a membrana. Um sensível marcador de dano a lipídio induzido por radical livre é a concentração de isoprostanos no plasma. Entretanto os efeitos da desidratação sobre a atividade da SOD e a concentração de isoprostanos no plasma não foram estudados até o momento.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos da desidratação induzida pelo exercício sobre o fluxo de glutatona, atividade da SOD e concentração de isoprostanos no sangue venoso e arterial em humanos no repouso e durante o exercício.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Participantes. Sete adultos jovens fisicamente ativos (idade $19,5 \pm 0,2$ anos, estatura de $178,6 \pm 0,9$ cm, massa corporal total de $74,6 \pm 3,3$ kg) foram recrutados. Os participantes foram informados sobre os riscos e benefícios envolvidos nos experimentos e assinaram o termo de consentimento informado (ANEXO). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Brunel University (ANEXO). Todos os procedimentos estavam de acordo com o código da Associação Médica de Ética (Declaração de Helsinki). Os participantes visitaram o laboratório em seis ocasiões separadas.

5.2.2 Visitas preliminares. Durante a primeira visita os participantes realizaram um teste máximo em cicloergômetro até a exaustão para determinar o pico de potência (330 ± 15 W). Após 30 minutos de repouso foi realizado um protocolo de exercício progressivo até a exaustão no ergômetro de extensão de joelho unilateral com carga inicial de 10 W com incrementos de 10 W/min (numa cadência entre 70 – 80 rpm) resultando num pico de potência de $43,5 \pm 2,7$ W. Estes parâmetros foram utilizados para calcular a intensidade das sessões seguintes de aclimatização, sessão principal de desidratação induzida pelo exercício e sessões de extensão unilateral de joelho.

Nas visitas seguintes, os participantes realizaram sessões de aclimatização quando pedelaram em ambiente quente para aumentar a tolerância ao calor e a taxa de sudorese a fim de que a desidratação fosse atingida mais facilmente na visita principal. A duração das sessões de aclimatização foi aumentada de forma progressiva. Assim, os participantes pedelaram por 30 minutos na primeira sessão, 45 minutos na segunda sessão seguidos por 60 e 120 minutos nas sessões seguintes. Os participantes não estavam engajados em dietas específicas contendo antioxidantes e foram orientados a evitar sessões de exercício intenso, ingestão de cafeína e álcool por pelo menos 24 h antes do experimento principal e a ingestão de antioxidantes por pelo menos uma semana antes do experimento.

5.2.3 Visita experimental principal. No dia da visita principal, os participantes chegaram ao laboratório aproximadamente 2 horas antes do experimento após um café da manhã leve. Um monitor de frequência cardíaca foi colocado no peito dos participantes e o termômetro retal foi inserido 10 cm na passagem retal. Enquanto permaneciam em repouso em posição supina, cateteres foram inseridos na veia femoral do membro inferior ativo (esquerdo) e na artéria radial direita. O cateter da veia femoral foi posicionado de 1 a 2 centímetros proximal ao ligamento inguinal. Os participantes

em seguida se deslocaram para a o laboratório principal e repousaram na cadeira reclinada do ergômetro de extensão de joelho (Ergometer LE220, FBJ Engineering, Denmark), o pé e o tornozelo esquerdo foram inseridos na bota do ergômetro de extensão de joelho. Os membros inferiores dos participantes foram suspensos nas condições de repouso.

Amostras de sangue venoso e arterial foram coletadas e o fluxo sanguíneo femoral foi examinado em repouso e durante o exercício de extensão de joelho unilateral de intensidade moderada (23 ± 1 W a 65 rpm por 6 minutos) em quatro diferentes condições consecutivas: *1) Controle* (euhidratado), *2) Desidratação leve*, aproximadamente 2% de redução na massa corporal (SECA Ltd, Birmingham, UK), *3) Desidratação moderada*, aproximadamente 3,5% de redução na massa corporal e *4) Reidratação*, depois de repor as perdas de massa corporal ao ingerir bebida carboidratada. Para atingir desidratação leve e depois moderada, os participantes realizaram 60 minutos pedalando em um ciclo ergômetro eletromagnético (Excalibur Lode, Groningen, The Netherlands) em uma câmara ambiental com temperatura de 37°C e 60% de umidade relativa do ar numa intensidade de 50% do pico de potência para induzir desidratação via perda de suor.

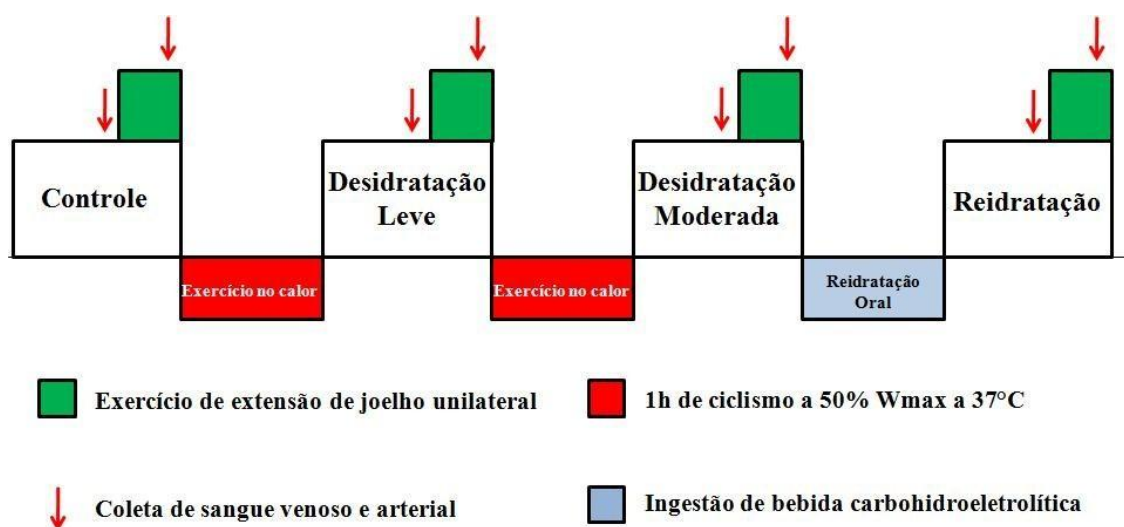


FIGURA 6 - Esquema experimental da visita principal.

5.2.4 Medidas hemodinâmicas do membro inferior. O fluxo sanguíneo femoral foi mensurado na artéria femoral de 2-3 cm proximal ao ponto de bifurcação utilizando ultra som Doppler (Vivid 7 Dimension, GE Medical, Horton, Norway), o qual foi equipado com uma sonda longitudinal 10L (GE medical systems, UK). O diâmetro da artéria foi determinado após a obtenção de três imagens 2D com vista longitudinal de 40 quadros por segundo dependendo da profundidade da artéria. O diâmetro foi calculado usando medidas obtidas das fases sistólicas e diastólicas correspondentes a 1/3 e 2/3 do diâmetro do vaso respectivamente (Rådegran, 1997). A velocidade média do sangue ($V_{média}$) foi calculada a partir do ângulo de insonação consistentemente abaixo de 60° (Râdergan, 1997) e com o volume de amostragem posicionado no centro da artéria femoral. A velocidade do sangue foi calculada considerando a média de três medidas, cada uma consistindo de 10 a 12 perfis de velocidade. A contribuição da turbulência que ocorre na parede vascular para a medida do fluxo sanguíneo foi reduzida usando filtro de rejeição de baixa velocidade. Por fim, o fluxo sanguíneo femoral (L/min) foi calculado pela equação $V_{média} \times \pi (diâmetro\ do\ vaso/2)^2 \times 6 \times 10^4$.

5.2.5 Preparação do Sangue. Amostras de sangue venoso e arterial (10 mL cada) foram coletadas em duas seringas distintas. As amostras de cada seringa foram divididas em cinco alíquotas de 2 mL em tubos com K2-EDTA e mantidos no gelo. Uma alíquota foi mantida como sangue total para posterior determinação da razão glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG). Para GSH, 50 µL de sangue total foram adicionados a um microtubo e congelados para posterior análise. Para GSSG, 100 µL de sangue total foram adicionados a um microtubo contendo 10 µL de 1-metil-2-

vinilpiridina trifluormetano-sulfonato (M2VP) para prevenir a participação da forma reduzida no ensaio enzimático sem inibir a atividade da glutatona redutase, e imediatamente colocado em nitrogênio líquido. A alíquota remanescente do sangue total foi centrifugada a 1000 g por 10 minutos a 4°C para a separação do plasma. Um mL de plasma foi depositado em um microtubo contendo 10 µL de 0,005% de hidroxitolueno butilado (BHT) para posterior análise de isoprostanos. A camada que separa os eritrócitos do plasma contendo principalmente leucócitos foi removida e descartada. Uma alíquota de eritrócitos para a determinação de SOD foi lisada com 1:4 (v/v) de água ultra pura gelada e centrifugada a 10,000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (lisado de eritrócitos) foi removido e estocado para posterior determinação de atividade total de SOD no eritrócito. Os 2 mL remanescentes de sangue foram usados para análise da hemoglobina e do hematócrito no analisador de gases sanguíneo (Radiometer, Copenhagen, Denmark) para estimar as alterações no volume plasmático como descrito por Dill & Costill (1974).

5.2.6 Análise dos Marcadores de Estresse Oxidativo. A GSH foi determinada por meio de 5,5'-ditibios-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) que reage com a GSH para formar um produto espectrofotometricamente detectável a 412 nm (Calbiochem, Nottingham, UK). O kit comercial foi desenvolvido para a determinação de GSH e GSSG em sangue total. A GSSG foi determinada pela redução de GSSG a GSH usando DTNB. A atividade da SOD foi mensurada por meio de sal tetrazolium para a detecção de radicais superóxidos gerados pela xantina oxidase e hipoxantina. A absorbância foi lida a 450 nm após um período de incubação de 20 minutos (Calbiochem, Nottingham, UK). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para exibir 50% de dismutação do radical superóxido. Os isoprostanos livres no plasma foram mensurados por um kit comercial de imunensaio enzimático (Cayman

Chemical, Estonia). Resumidamente, o ensaio é baseado na competição entre 8-isoprostanos e um conjugado de 8-isoprostanos-acetilcolinesterase para um número limitado de ligações específicas em anticorpo de ratos para 8-isoprostanos.

5.2.7 Cálculos. Os fluxos de GSH e GSSH foram calculados a partir da multiplicação da diferença arteriovenosa destes marcadores pelo fluxo sanguíneo correspondente. Os valores são expressos em $\mu\text{M}/\text{min}$. Todas as concentrações descritas no presente estudo foram corrigidas pelas alterações observadas no volume plasmático (Dill & Costill, 1974).

5.2.8 Análise estatística. A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Para identificar diferenças nos resultados com distribuição normal, análise de variância de dois caminhos para medidas repetidas foi empregada. Onde uma interação significativa foi aparente, as diferenças foram avaliadas pelo teste post-hoc de Tukey e teste t pareado com ajustes de Bonferroni para comparações múltiplas. Sempre que os dados foram não-paramétricos, as diferenças foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Os dados foram tratados usando SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Hidratação e mudanças na temperatura com desidratação e reidratação.

A massa corporal total diminuiu progressivamente da condição controle para desidratação leve e moderada (de $74,6 \pm 2,8$ para $73,3 \pm 2,7$ e $72,1 \pm 2,7$ kg respectivamente, $P < 0,05$) (Figura 7), correspondendo a $1,9 \pm 0,1$ e $3,4 \pm 0,1\%$ de diminuição na massa corporal total respectivamente. Estas mudanças foram acompanhadas por reduções no volume plasmático (Tabela 3; $P < 0,05$). Após a

reidratação a massa corporal foi completamente restabelecida ($74,6 \pm 2,8$ kg) e o volume plasmático foi elevado acima dos valores de controle (Tabela 1 $P < 0,05$). A temperatura retal (T_c) aumentou significativamente com desidratação leve e moderada (de $37,1 \pm 0,1$ para $37,8 \pm 0,1$ e $37,9 \pm 0,1$ °C respectivamente, $P < 0,05$) e retornou para os valores de controle após a reidratação ($37,2 \pm 0,1$ °C). A temperatura média da pele aumentou com a desidratação em comparação a condição controle (de $34,4 \pm 0,1$ para $35,4 \pm 0,1$ respectivamente, $P < 0,05$) e permaneceu elevada após a reidratação ($35,0 \pm 0,1$, $P < 0,05$). A hipovolemia induzida pela desidratação foi acompanhada por aumentos na osmolaridade sanguínea, eletrólitos sanguíneos e conteúdo arterial de oxigênio ($P < 0,05$). Os valores de massas corporais representam condições de repouso. Durante o exercício, esta variável permaneceu inalterada ou mudou apenas discretamente comparado aos valores correspondentes em repouso.

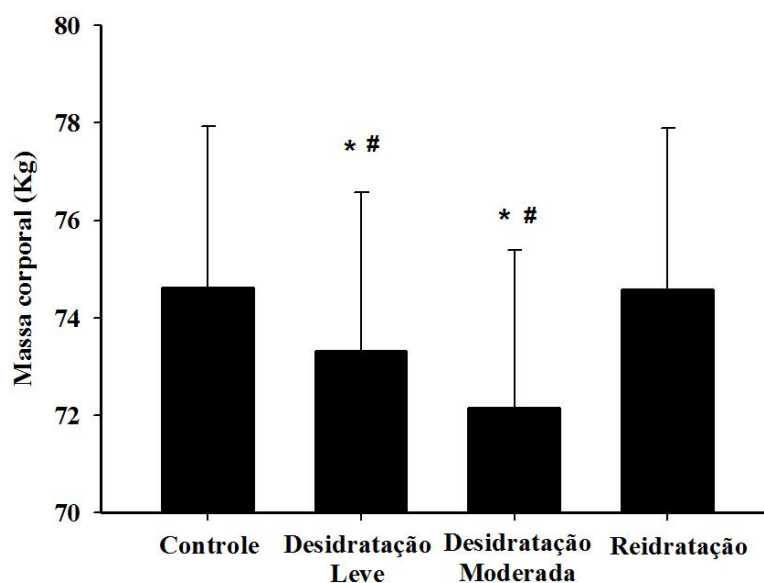


FIGURA 7 - Massa corporal total nas situações controle, desidratação leve, desidratação moderada e reidratação. * diferente do controle. # diferente da reidratação, $p < 0,05$.

Tabela 2. Variáveis hemodinâmica e eletrólitos no sangue venoso e arterial.

		Controle		Desidratação Leve		Desidratação Moderada		Reidratação	
		Repouso	Exercício	Repouso	Exercício	Repouso	Exercício	Repouso	Exercício
Hb (g/dl)	A	14,6 ± 1	14,9 ± 2	15,1 ± 2*	15,3 ± 2*	15,4 ± 1*#	15,5 ± 2*#	14,1 ± 2*#†	14,4 ± 2*#†
	V	14,7 ± 2	15,2 ± 2	15,1 ± 2*	15,5 ± 2	15,4 ± 2*#	15,7 ± 2*#	14,2 ± 2*#†	14,5 ± 2*#†
Htc (%)	A	44,9 ± 0,4	45,7 ± 0,5	46,1 ± 0,5*	47,1 ± 0,5	47,3 ± 0,5	47,7 ± 0,4	43,5 ± 0,5	44,4 ± 0,5
	V	45,3 ± 0,4	46,8 ± 0,5	46,5 ± 0,5*	47,4 ± 0,6	47,4 ± 0,4	48,1 ± 0,4	43,7 ± 0,4	44,6 ± 0,5
Osmolalidade (mOsm/kg)	A	287 ± 2	288 ± 3	292 ± 3*	291 ± 3	295 ± 3*#	295 ± 3#	281 ± 3*#†	284 ± 3*#
	V	287 ± 2	290 ± 3	291 ± 3	293 ± 3	294 ± 3*#	297 ± 3*#	282 ± 3*#†	285 ± 3#†
Volume Plasmático (%)	A	0 ± 0	-3,2 ± 1,5	-5,1 ± 0,9*	-8,5 ± 1*	-9,2 ± 0,7*#	-10,7 ± 0,6*#	6,0 ± 1,2*#†	2,3 ± 1,2*#†
	V	0 ± 0	-5,8 ± 0,4	-4,9 ± 0,8	-8,3 ± 1,2*	-7,9 ± 0,6*	-10,9 ± 0,5*#	6,4 ± 0,8*#†	2,9 ± 0,9*#†
Na⁺ (mmol/l)	A	141 ± 1	141 ± 2	143 ± 2*	143 ± 2*	145 ± 2*#	145 ± 2#	137 ± 1*#†	139 ± 2#†
	V	141 ± 1	142 ± 1	143 ± 2*	144 ± 2	145 ± 2*#	147 ± 2#	138 ± 1*#†	140 ± 2#†
Cl⁻ (mmol/l)	A	108 ± 2	108 ± 2	110 ± 2	110 ± 2*	111 ± 2*	111 ± 2*#	105 ± 2*#†	106 ± 2#†
	V	106 ± 2	105 ± 2	108 ± 2*	107 ± 2*	110 ± 2	109 ± 2*#	104 ± 1*#†	104 ± 2#†
K⁺ (mmol/l)	A	3,7 ± 0,1	3,9 ± 1	3,8 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1*#	4,3 ± 0,1	3,5 ± 0,05†	3,7 ± 0,05#†
	V	3,7 ± 0,1	4,2 ± 0,05	3,9 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,4 ± 0,1	3,5 ± 0,05#†	3,9 ± 0,07#†

Valores são média ± SEM para 7 participantes. * Diferente do controle, P < 0,05. # Diferente de desidratação leve, P < 0,05. † Diferente de desidratação moderada, P < 0,05.

5.3.2 Fluxo sanguíneo femoral em repouso e no exercício. Em repouso, o fluxo sanguíneo aumentou com desidratação leve e moderada ($0,38 \pm 0,004$, $0,64 \pm 0,006$ e $0,77 \pm 0,009$ L/min, respectivamente, $P < 0,05$) e permaneceu elevado após a reidratação ($0,63 \pm 0,05$ L/min). Durante o exercício, o fluxo sanguíneo permaneceu inalterado com desidratação leve, mas aumentou com desidratação moderada e permaneceu elevado após a reidratação ($1,64 \pm 0,09$, $1,88 \pm 0,1$ e $1,95 \pm 0,009$ L/min, respectivamente, $P < 0,05$).

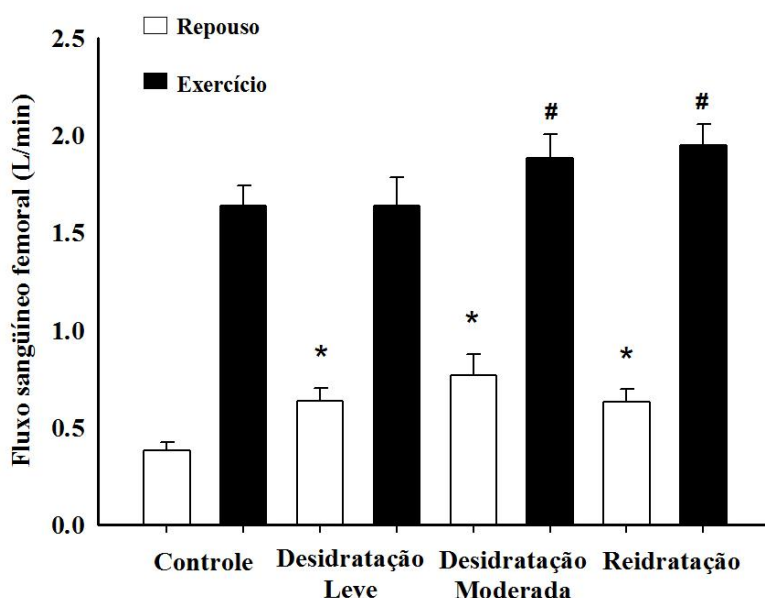


FIGURA 8. Fluxo sanguíneo femoral em repouso e durante o exercício nas diferentes condições. * diferente do repouso controle # diferente do exercício controle, $p < 0,05$.

5.3.3 Efeitos da desidratação leve. A desidratação leve não alterou as concentrações arteriais e venosas de GSH e GSSG nem no repouso e nem durante o exercício. Considerando o fluxo de GSH e GSSG, a desidratação leve não causou alterações significativas no repouso e no exercício. A atividade da SOD no sangue

arterial também não foi alterada pela desidratação leve. Por outro lado, no sangue venoso, a atividade da SOD foi diminuída durante o exercício quando comparado ao exercício na condição controle ($0,184 \pm 0,005$ vs. $0,161 \pm 0,004$, $P < 0,05$). A concentração plasmática de isoprostanos também não foi alterada pela desidratação leve nem no repouso e nem durante o exercício.

5.3.4 Efeitos da desidratação moderada. A desidratação moderada também não alterou significativamente as concentrações de GSH e GSSG nem no sangue arterial nem no sangue venoso. Não houve alteração no fluxo de GSSG na circulação, por outro lado, houve uma liberação significativa de GSH na circulação durante o exercício ($P < 0,05$) (Figura 12). A atividade da SOD também não foi alterada no sangue arterial, mas diminuiu significativamente no sangue venoso em repouso e durante o exercício quando comparado com as respectivas condições no controle ($P < 0,05$). As concentrações plasmáticas de isoprostanos diminuíram significativamente no sangue arterial em repouso e em exercício ($P < 0,05$) sendo que no sangue venoso a diminuição só foi observada durante o exercício ($P < 0,05$).

5.3.5 Efeitos da reidratação. A reidratação não alterou o conteúdo arterial de GSH, mas aumentou significativamente o conteúdo venoso de GSH durante o exercício ($P < 0,05$). A GSSG não foi alterada pela reidratação nem no repouso nem durante o exercício tanto no sangue arterial quanto no sangue venoso. Não houve alteração significativa considerando o fluxo da GSH e da GSSG com a reidratação no repouso e durante o exercício. A atividade da SOD não foi alterada pela reidratação no sangue arterial, mas aumentou a atividade da SOD no sangue venoso em repouso ($P < 0,05$). As concentrações plasmáticas de isoprostanos no sangue arterial não foram alteradas pela

reidratação. Por outro lado, no sangue venoso, houve um aumento nas concentrações de isoprostanos em repouso ($P < 0,05$).

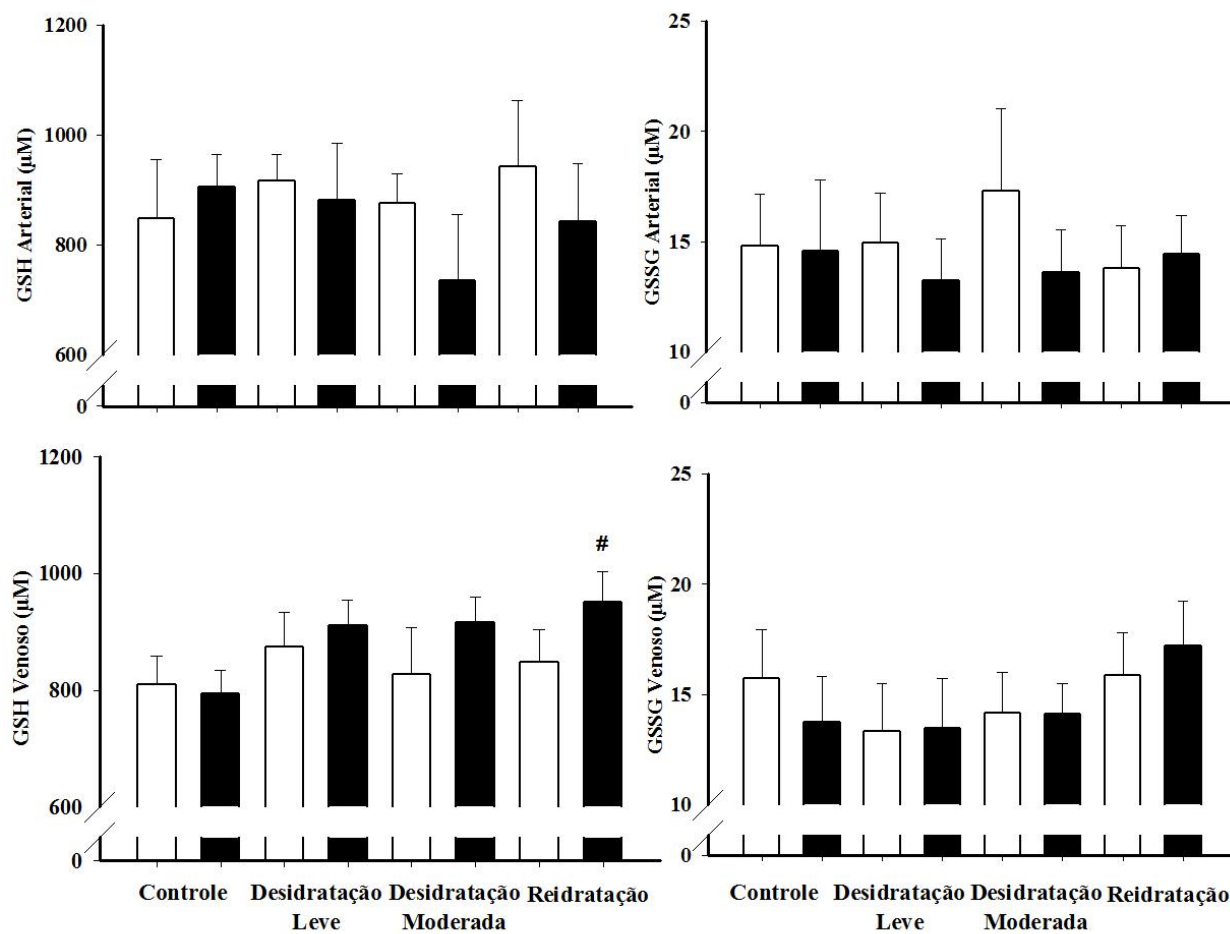


FIGURA 9. Glutathiona reduzida (gsh) e oxidada (gssg) no sangue arterial e

venoso. □ repouso ■ exercício. # diferente do exercício controle, $p < 0,05$.

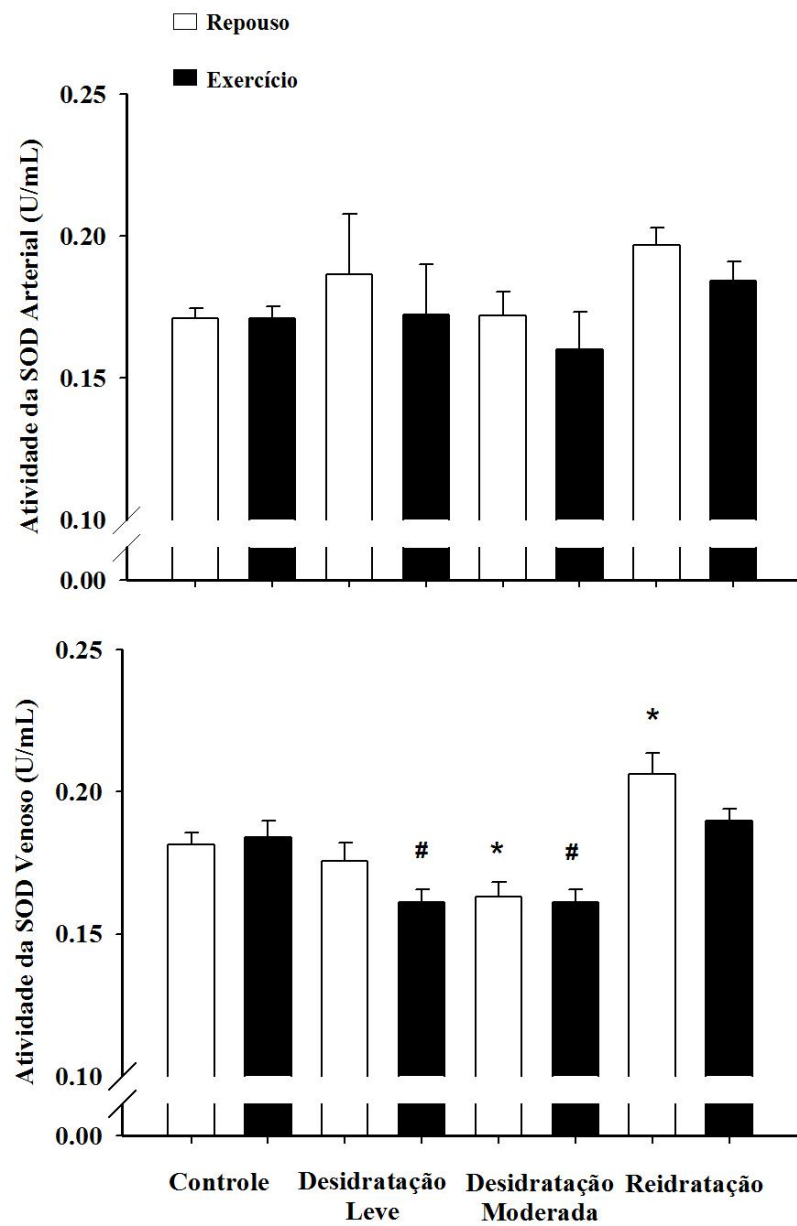


FIGURA 10. Atividade da superóxido dismutase no eritrócito no sangue arterial e venoso. * diferente do controle repouso. # diferente do controle exercício, $p < 0,05$.

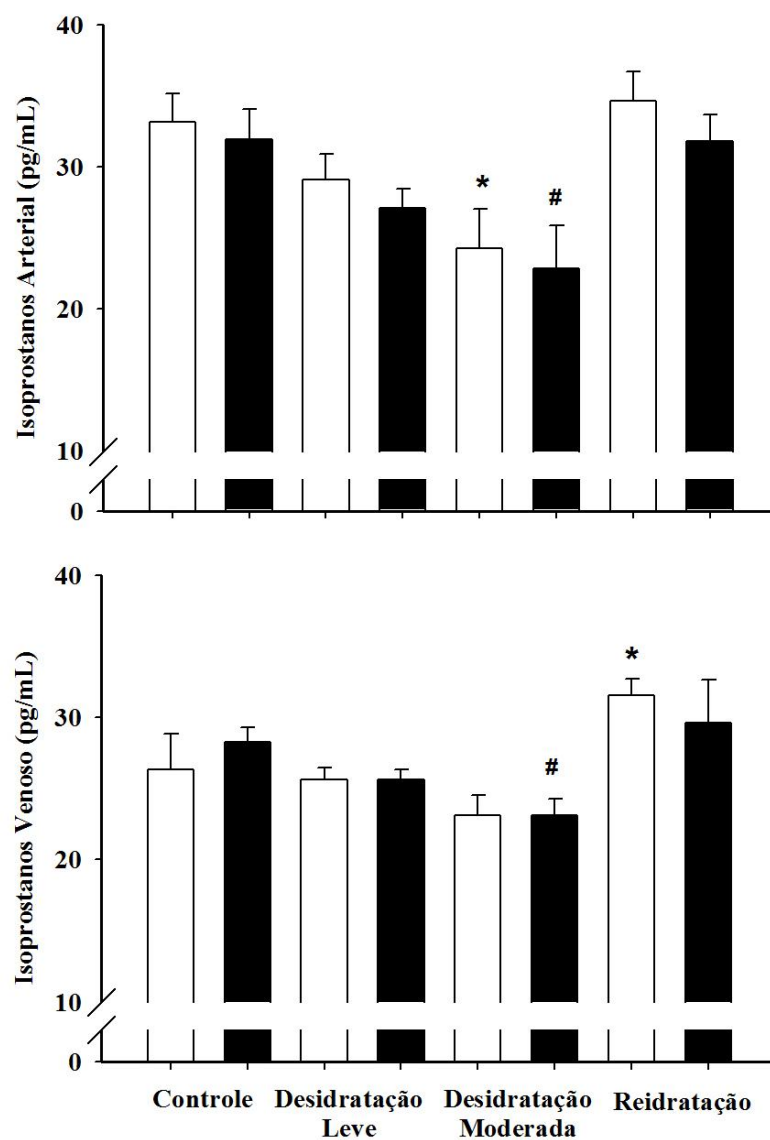


FIGURA 11. Concentração de isoprostanos livres no plasma arterial e venoso em repouso e durante o exercício com diferentes níveis de desidratação e reidratação. * diferente do controle repouso, # diferente do controle exercício, $P < 0,05$.

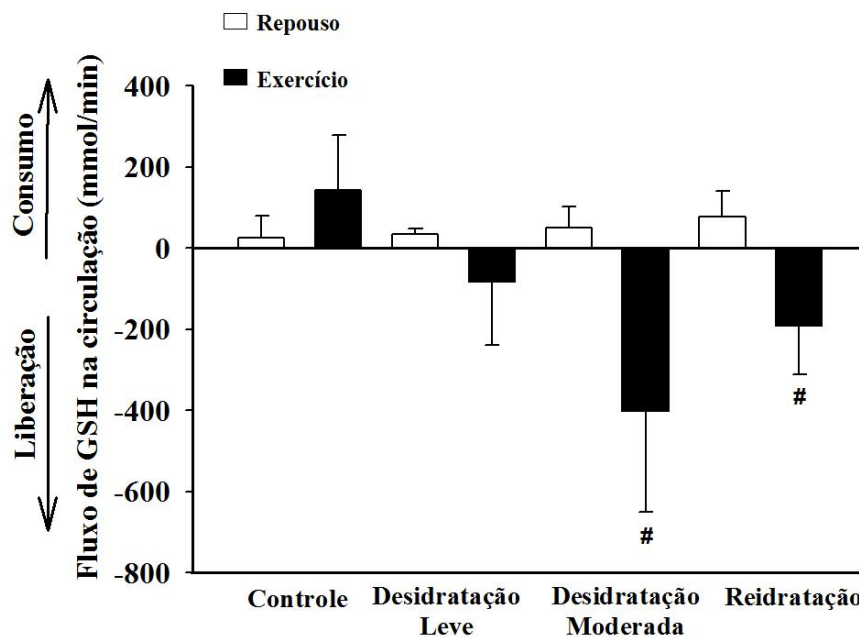


FIGURA 12. Fluxo de glutatona reduzida na circulação. # diferente do controle exercício. $P < 0,05$.

5.4 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi que a desidratação moderada (redução de 3,5% na massa corporal total) induziu a liberação de GSH na circulação durante o exercício. Além disso, alterações importantes na atividade da SOD e na concentração de isoprostanos foram observadas com a reidratação, tanto em repouso quanto durante o exercício. Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro experimento a mensurar os efeitos de diferentes níveis de desidratação induzida por exercício e subsequente reidratação sobre marcadores de estresse oxidativo no sangue venoso e arterial, em repouso e durante o exercício. Alguns autores mensuraram os efeitos da desidratação sobre o estresse oxidativo (McAnulty et al. 2005, Paik et al. 2009) no entanto, estes estudos não determinaram as respostas no sangue arterial e venoso. Na verdade, o local de coleta do sangue em pesquisas mensurando marcadores circulatórios de estresse oxidativo ocorre geralmente na região antecubital, distante da musculatura ativa

permitindo que os marcadores de estresse oxidativo induzido pelo exercício se modifiquem no percurso (Bailey et al. 2004). Portanto, a medida próxima ao local de produção dos radicais livres, no caso do presente protocolo, a veia femoral da musculatura esquelética ativa, pode representar melhor o quadro oxidativo na circulação sanguínea.

No presente estudo, as concentrações absolutas de GSH e GSSG no sangue venoso e arterial não foram afetadas significativamente por ambos os níveis de desidratação e a concentração de GSH foi aumentada durante o exercício com a reidratação. Por outro lado, foi observada uma maior liberação de GSH na circulação durante o exercício com desidratação moderada. Tem sido proposto que o fígado disponibiliza GSH para os tecidos, incluindo o músculo esquelético. Esta proposição é baseada em resultados de estudos que demonstraram a diminuição na concentração de GSH no fígado de animais durante o exercício (Sen et al 1992, Leewenburgh et al. 1995, Leeuwenburgh et al. 1996) e aumentos na concentração de GSH no plasma e no músculo. A GSH tem um papel antioxidante primário, pois atua como substrato para a enzima glutathione peroxidase que oxida a GSH a dissulfeto de glutathione (GSSG), contribuindo para a remoção de hidroperóxidos (Jones, 2008). No presente estudo a GSH foi mensurada no sangue total o que inclui tanto a concentração plasmática quanto eritrocitária e, portanto é difícil apontar a fonte desta maior liberação observada com desidratação moderada durante o exercício. Entretanto, como não foi observado diferença na concentração e no fluxo de GSSG, é provável que essa liberação de GSH seja o reflexo de um movimento transitório do interstício para o espaço intravascular devido a uma provável redução do volume intersticial induzido pela desidratação (Hellsten, 2010 – consulta pessoal). Outra evidência a favor desta hipótese é o fato da reidratação atenuar a liberação de GSH na circulação. Uma possível explicação para

essa atenuação seria o restabelecimento do volume intersticial que acontece de forma gradual e restabeleceria as concentrações intersticiais de GSH.

Estudos sugerem que o músculo esquelético pode ser uma fonte de GSH (Sen et al. 1992, Burk et al. 1995, Coatgreave et al. 2002) em condições extremas e quando as reservas hepáticas encontram-se depletadas. Além disso, grande parte da GSH é usualmente transportada na circulação pelos eritrócitos (Meister 1988). Um estudo mensurou o fluxo de GSH total no plasma em resposta ao exercício (Hellsten et al. 2001) e devido a grande variabilidade nos resultados, não encontraram diferença significativa. Portanto, como a medida de GSH no sangue total inclui tanto a concentração plasmática quanto a eritrocitária, é possível que o sangue total seja mais adequado para reportar o fluxo da GSH, uma vez que sua maior concentração é encontrada no eritrócito, enquanto apenas uma pequena quantidade deste tripeptídeo é encontrada no plasma (Gohil et al. 1988). Experimentos futuros mensurando o fluxo de GSH no sangue total juntamente com a concentração intramuscular de GSH são necessários para verificar o fluxo deste tripeptídeo entre a circulação e o músculo esquelético ativo.

No presente protocolo, a desidratação leve e moderada induziram reduções na atividade da SOD no sangue venoso. Tais resultados podem ser interpretados como uma menor defesa antioxidante, pois a SOD é responsável pela dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2006). O sangue venoso é caracterizado pelo conteúdo de O_2 menor em relação ao sangue arterial (146 vs. 210 mL/L respectivamente) (González-Alonso et al. 2003). É possível que a menor presença de O_2 no sangue venoso em relação ao sangue arterial esteja associada a uma menor atividade da SOD durante o exercício em humanos desidratados quando há uma maior extração de O_2 pela musculatura ativa. Nenhum estudo que determinou os efeitos da

desidratação sobre o estresse oxidativo em humanos utilizou a atividade da SOD como marcador de estresse oxidativo. Paik et al. (2009) mensuraram malondialdeído, e dano ao DNA de linfócitos em humanos que se desidrataram em sauna e se reidrataram ingerindo água ou bebida esportiva. Os resultados apontaram que a reidratação atenuou o estresse oxidativo induzido pela desidratação. Entretanto, no presente experimento, a reidratação induziu um aumento significativo na atividade da SOD no sangue venoso em repouso. Aumentos na atividade da SOD são normalmente induzidos por aumentos na produção de radical superóxido (Ji 1993). Isto sugere que a reidratação com bebida contendo carboidrato e eletrólito pode ter induzido um quadro de elevada produção de radical superóxido. Pesquisas têm demonstrado que a presença de frutose em bebidas esportivas induz a formação de radical superóxido (Fernandez et al. 2009). Os mecanismos propostos na literatura para explicar a relação entre frutose e produção aumentada de radicais livres envolvem a produção intra-hepática exacerbada de lípidos e a subsequente formação de ROS (Kelley et al. 2004), a autoxidação periférica de triglicérides sintetizados a partir da frutose (Mayes 1993) e a combinação da frutose com a hemoglobina que promove reações de oxidação devido a liberação de Fe^{2+} pela degradação da heme mesmo na presença de concentrações fisiológicas de frutose (Bose et al. 2008).

McAnulty et al. (2005) determinaram os efeitos da hipertermia e desidratação sobre o estresse oxidativo induzido pelo exercício e demonstraram que tanto o exercício na condição controle quanto na condição hipertermia promoveram aumentos nas concentrações plasmáticas de isoprostanos e hidroperóxidos lipídicos. No entanto, apenas o exercício realizado no calor promoveu aumento significativo de isoprostanos. No presente estudo, não encontramos aumentos significativos na concentração de isoprostanos com ambos os níveis (leve e moderado) de desidratação induzida pelo

exercício. A explicação para estes resultados conflitantes pode estar no desenho experimental dos dois estudos. No presente estudo a desidratação foi induzida por 2 sessões de ciclismo no calor enquanto no estudo de McNulty e colaboradores foi utilizado corrida contínua em esteira rolante. Apesar da similaridade entre as intensidades (50% do pico de potência no presente estudo e 50% do $VO_2\text{max}$ no estudo de McNulty e colaboradores), o exercício em esteira representa um estresse mecânico maior para o organismo e pode, portanto, ter afetado as concentrações de isoprostanos de forma mais dramática. Por outro lado, a reidratação promoveu um aumento significativo na concentração de isoprostanos plasmáticos caracterizando estresse oxidativo induzido por reidratação. Estes resultados corroboram com nossos achados de aumento na atividade da SOD com reidratação.

Uma limitação do presente estudo é o fato de todas as condições experimentais terem acontecido no mesmo dia, o que pode ter interferido nos achados do estudo. Por outro lado, devido ao fato do experimento ser invasivo (presença de cateter intravenoso e intrarterial) impossibilitou que as condições experimentais acontecessem em dias distintos. Portanto, estudos futuros utilizando grupos distintos ou desenho experimental randomizado são necessários para esclarecer se os achados do presente estudo são consistentes.

Em conclusão este estudo demonstrou que a desidratação moderada induziu a liberação de GSH na circulação durante o exercício. É possível especular que mudanças no volume intersticial induzido pela desidratação tenham contribuído para essa resposta. Além disso, a reidratação com bebida carboidroeletrolítica induziu estresse oxidativo, possivelmente pela presença de frutose na bebida.

6. CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E DIREÇÕES

É possível concluir com a presente tese que:

- O estresse térmico, independente da desidratação, induziu estresse oxidativo em repouso, mas não durante exercício moderado com massa muscular isolada, pois um aumento na defesa antioxidante durante o exercício evitou o estresse oxidativo induzido por hipertermia.
- A desidratação moderada induzida pelo exercício causou um aumento na liberação do antioxidante glutatona na circulação durante o exercício moderado com massa muscular isolada e diminuiu a atividade da enzima superóxido dismutase.
- A reidratação com solução contendo carboidrato e eletrólito promoveu estresse oxidativo evidenciado pelo aumento na atividade da enzima superóxido dismutase e da concentração de isoprostanos no plasma.

Esta tese deu origem a uma série de projetos que ajudarão a esclarecer os mecanismos envolvidos com as respostas aqui observadas. Portanto, estudos envolvendo estresse térmico e desidratação com coletas de sangue arterial e venoso bem como tecido muscular (biópsia) serão realizados para esclarecer se as alterações observadas no sangue refletem as alterações intramusculares. Além disso, este estudo terá como objetivo esclarecer o fluxo da glutatona na circulação e no músculo durante o exercício em situação de desidratação.

Outro estudo verificando os efeitos independentes da hipertermia em participantes que serão mantidos euhidratados ao ingerirem uma bebida isotônica sem carboidrato deve ser realizado para esclarecer as relações entre alterações no volume plasmático e estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS

1. ACSM position stand on exercise and fluid replacement (2007) *Med Sci Sports Exerc.* 39(2):350-7
2. Alessio HM, Goldfarb AH (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol* 64: 1333–1336
3. Andersen P, Adams RP, Sjogaard G, Thorboe A, Saltin B (1985) Dynamic knee extensor exercise as model for study of isolated exercising muscle in humans. *J Appl Physiol* 59(5):1647-1653
4. Armstrong LE, Costill DL, Fink WJ (1985) Influence of diuretic-induced dehydration on competitive running performance. *Med Sci Sports Exerc* 17:456–461
5. Astrand PO, Rodahl K, Dahl HA, Stromme SB (2003) *Textbook of work physiology: Physiological bases of exercise.* 4th Ed. Human Kinetics.
6. Bachle L, Eckerson J, Albertson L, Ebersole K, Goodwin J, Petzel D(2001) The effect of fluid replacement on endurance performance. *J Strength Cond Res* 15(2):217-24
7. Bailey DM, Young IS, McEneny J, Lawrenson L, Kim J, Barden J, Richardson RS (2004) Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(4):H1689-99
8. Baker LB, Dougherty KA, Chow M, Kenney WL (2007) Progressive dehydration causes a progressive decline in basketball skill performance. *Med Sci Sports Exerc* 39(7):1114-23.
9. Barycki JJ (2008) Antioxidant molecules and redox cofactors. In. Banerjee R. *Redox Biochemistry* 1st Edition. Wiley Interscience.

10. Banerjee R (2008) Redox metabolism and life. In. Banerjee R. Redox Biochemistry 1st Edition. Wiley Interscience
11. Bean WB, Eichna LW (1943) Performance in relation to environmental temperature. Reactions of normal young men to simulated desert environment. Fed. Proc 2:144–158
12. Below PR, Mora-Rodríguez R, González-Alonso J, Coyle EF (1995) Fluid and carbohydrate ingestion independently improve performance during 1 h of intense exercise. Med Sci Sports Exerc 27(2):200-10
13. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A (2002) Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. J Dairy Sci 85(9):2173-9
14. Bernard C (1865) Introduction à l'Etude de la Médecine expérimentale. Baillière ET Fils, Paris.
15. Bigard AX, Sanchez H, Claveyrolas G, Martin S, Thimonier B, Arnaud MJ (2001) Effects of dehydration and rehydration on EMG changes during fatiguing contractions. Med Sci Sports Exerc 33:1694–1700
16. Bose, T., & Chakraborti, A. S. (2008). Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: Implication for oxidative stress in diabetes mellitus. Biochimica et Biophysica Acta, 1780, 800–808
17. Brown AH (1947) Dehydration exhaustion. In: Physiology of Man in the Desert, Adolph EF (Ed.). New York: Interscience Publishers, Inc., pp. 208–225
18. Bruskov VI, Malakhova LV, Masalimov ZK, Chernikov AV (2002) Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. Nucleic Acids Res 15;30(6):1354-63

19. Buono MJ, Jechort A, Marques R, Smith C, Welch J (2007) Comparison of infrared versus contact thermometry for measuring skin temperature during exercise in the heat. *Physiol Meas* 28(8):855-9
20. Burk RF, Hill KE (1995) Reduced glutathione release into rat plasma by extrahepatic tissues. *Am J Physiol* 269(3 Pt 1):G396-9
21. Carter JE, Gisolfi CV (1989) Fluid replacement during and after exercise in the heat. *Med Sci Sports Exerc* 21(5):532-9
22. Chevront SN, Carter R 3rd, Sawka MN (2003). Fluid balance and endurance exercise performance. *Curr Sports Med Rep* 2(4):202-8
23. Chevront SNR, Carter R 3rd, Montain SJ, Stephenson LA, Sawka MN (2004) Influence of hydration and air flow on thermoregulatory control in the heat. *J Thermal Biol* 29:471–477
24. Costill DL, Fink WJ (1974) Plasma volume changes following exercise and thermal dehydration. *J Appl Physiol* 37(4):521-5
25. Cotgreave IA, Goldschmidt L, Tonkonogi M, Svensson M (2002) Differentiation-specific alterations to glutathione synthesis in and hormonally stimulated release from human skeletal muscle cells. *FASEB J* 16(3):435-7
26. Coyle EF, Montain SJ (1992) Benefits of fluid replacement with carbohydrate during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 24(9 Suppl):S324-30
27. Crandall CG, González-Alonso J (2010) Cardiovascular function in the heat-stressed human. *Acta Physiol (Oxf)* 199(4):407-23
28. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, Grinton S (1993) High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc* 25: 1135–1140

29. Davis SL, Crandall CG (2010) Heat stress alters hemodynamic responses during the Valsalva maneuver. *J Appl Physiol* [Epub ahead of print]
30. Dill DB, Costill DL (1974) Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37(2):247-8
31. Dougherty KA, Baker LB, Chow M, Kenney WL (2006). Two percent dehydration impairs and six percent carbohydrate drink improves boys basketball skills. *Med Sci Sports Exerc* 38(9):1650-8.
32. El-Sayed MS, Ali N, El-Sayed Ali Z (2005) Haemorheology in exercise and training. *Sports Med* 35(8):649-70
33. Febbraio MA (2000) Does muscle function and metabolism affect exercise performance in the heat? *Exerc Sport Sci Rev* 28(4):171-6
34. Fernández JM, Da Silva-Grigoletto ME, Gómez-Puerto JR, Viana-Montaner BH, Tasset-Cuevas I, Túnez I, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F (2009) A dose of fructose induces oxidative stress during endurance and strength exercise. *J Sports Sci* 27(12):1323-34
35. Ferreira LF, Reid MB (2008) Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *J Appl Physiol* 104(3):853-60
36. Finaud J, Lac G, Filaire E (2006) Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36(4):327-58
37. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ (2009) Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 13;8:1
38. Gaebelin CJ, Senay LC Jr (1980) Influence of exercise type, hydration, and heat on plasma volume shifts in men. *J Appl Physiol* 49(1):119-23
39. Gohil K, Viguie C, Stanley WC, Brooks GA, Packer L (1988) Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 64(1):115-9

40. González-Alonso J, Calbet JA (2003) Reductions in systemic and skeletal muscle blood flow and oxygen delivery limit maximal aerobic capacity in humans. *Circulation* 107(6):824-30
41. González-Alonso J, Calbet JA, Nielsen B (1998) Muscle blood flow is reduced with dehydration during prolonged exercise in humans. *J Physiol.* 15;513:895-905
42. González-Alonso J, Crandall CG, Johnson JM (2008) The cardiovascular challenge of exercising in the heat. *J Physiol* 586(1):45-53
43. González-Alonso J, Mora-Rodríguez R, Below PR, Coyle EF (1997) Dehydration markedly impairs cardiovascular function in hyperthermic endurance athletes during exercise. *J Appl Physiol* 82(4):1229-36
44. González-Alonso J, Mora-Rodríguez R, Coyle EF (1999) Supine exercise restores arterial blood pressure and skin blood flow despite dehydration and hyperthermia. *Am J Physiol* 277(2 Pt 2):H576-83
45. González-Alonso J, Teller C, Andersen SL, Jensen FB, Hyldig T, Nielsen B (1999) Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. *J Appl Physiol* 86(3):1032-9
46. Grasso S, Scifo C, Cardile V, Gulino R, Renis M (2003) Adaptive responses to the stress induced by hyperthermia or hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(5):491-8
47. Green DJ, Carter HH, Fitzsimons MG, Cable NT, Thijssen DH, Naylor LH (2010) Obligatory role of hyperaemia and shear stress in microvascular adaptation to repeated heating in humans. *J Physiol* 1;588(Pt 9):1571-7

48. Greiner JG, Clegg ME, Walsh ML, White MD (2010) No effect of skin temperature on human ventilation response to hypercapnia during light exercise with a normothermic core temperature. *Eur J Appl Physiol* 109(1):109-15
49. Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57,(5 Suppl):715S-724S
50. Halliwell B, Gutteridge J (2006) *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford Bioscience
51. Hamilton MT, Gonzalez-Alonso J, Montain SJ, Coyle EF (1991) Fluid replacement and glucose infusion during exercise prevent cardiovascular drift. *J Appl Physiol* 71(3):871-7
52. Hardy JD, Dubois EF (1937) Regulation of heat loss from the human body. *Proc Natl Acad Sci USA* 23(12):624-31
53. Hargreaves M, Dillo P, Angus D, Febbraio M (1996) Effect of fluid ingestion on muscle metabolism during prolonged exercise. *J Appl Physiol* 80(1):363-6
54. Harrison MH (1985) Effects on thermal stress and exercise on blood volume in humans. *Physiol Rev* 65(1):149-209
55. Harrison MH, Edwards RJ, Cochrane LA, Graveney MJ (1983) Blood volume and protein responses to skin heating and cooling in resting subjects. *J Appl Physiol* 54(2):515-23
56. Hellsten Y (2010) Consulta pessoal por e-mail – 26 de Julho de 2010 (ANEXO).
57. Hellsten Y, Apple FS, Sjodin B (1996) Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 81: 1484–1487
58. Hellsten Y, Svensson M, Sjodin B, Smith S, Christensen A, Richter EA, Bangsbo J (2001) Allantoin formation and urate and glutathione exchange in

- human muscle during submaximal exercise. *Free Radic Biol Med* 1;31(11):1313-22
59. Higuchi M, Cartier LJ, Chen M, Holloszy JO (1985) Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol* 40: 281–286
60. Inayama T, Oka J, Kashiba M, Saito M, Higuchi M, Umegaki K, Yamamoto Y, Matsuda M (2002) Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols. *Life Sci* 15;70(17):2039-46
61. Institute of medicine (2005) Water. In: *Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate*, Washington, D.C.: National Academy Press, pp. 73–105
62. Jeukendrup AE, Gleeson M (2004) *Sport nutrition: an introduction to energy production and performance*. 1st ed. Human Kinetics.
63. Ji LL (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* 25(2):225-31
64. Ji LL, Fu R (1992). Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* 72(2):549-554
65. Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295(4):C849-68
66. Kargotich S, Goodman C, Keast D, Morton AR (1998) The influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical parameters used for monitoring exercise, training and sport. *Sports Med* 26(2):101-17

67. Kelley GL, Allan G, Azhar S (2004). High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology* 145, 548–555
68. Kozłowski S, Brzezińska Z, Kruk B, Kaciuba-Uściłko H, Greenleaf JE, Nazar K (1985) Exercise hyperthermia as a factor limiting physical performance: temperature effect on muscle metabolism. *J Appl Physiol* 59(3):766-73
69. Kusmic C, Picano E, Busceti CL, Petersen C, Barsacchi R (2000) The antioxidant drug dipyridamole spares the vitamin E and thiols in red blood cells after oxidative stress. *Cardiovasc Res* 18;47(3):510-4
70. Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, Pithon-Curi TC (2007) Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev* 128: 267–275
71. Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ (1990) Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, exercise training. *J Appl Physiol* 68: 2337–2343
72. Lawler JM, Kwak HB, Song W, Parker JL (2006) Exercise training reverses downregulation of HSP70 and antioxidant enzymes in porcine skeletal muscle after chronic coronary artery occlusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1756–R1763
73. Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL (1994) Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267: R439–R445

74. Leeuwenburgh C, Ji LL (1995) Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* 1;316(2):941-9
75. Leeuwenburgh C, Ji LL (1996) Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J Nutr* 126(7):1833-43
76. Lew H, Pyke S, Quintanilha A (1985) Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett* 17;185(2):262-6
77. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN (1987) Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56(3):313-6
78. MacDougall JD, Reddan WGW, Layton CR, Dempsey JA (1974) Effects of metabolic hyperthermia on performance during heavy prolonged exercise. *J Appl Physiol* 36(5):538-44
79. Maughan RJ, Watson P, Shirreffs SM (2007) Heat and cold: what does the environment do to the marathon runner? *Sports Med* 37(4-5):396-9
80. Maughan RJ, Leiper JB (1995). Effects of sodium content of ingested fluids on post-exercise rehydration in man. *Eur J Appl Physiol* 71:311–319
81. Mayes PA (1993) Intermediary metabolism of fructose. *American Journal of Clinical Nutrition* 58, 754S–765S
82. McAnulty SR, McAnulty L, Pascoe DD, Gropper SS, Keith RE, Morrow JD, Gladden LB (2005) Hyperthermia increases exercise-induced oxidative stress. *Int J Sports Med* 26(3):188-92
83. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 25;244(22):6049-55

84. Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205- 17208
85. Mitchell JB, Russo A (1983) Thiols, thiol depletion, and thermosensitivity. *Radiat Res* 95(3):471-85
86. Montain SJ, Coyle EF (1992) Influence of graded dehydration on hyperthermia and cardiovascular drift during exercise. *J Appl Physiol* 73(4):1340-50
87. Montain SJ, Sawka MN, Latzka WA, Valeri CR (1998) Thermal and cardiovascular strain from hypohydration: influence of exercise intensity. *Int J Sports Med* 19(2):87-91
88. Morrison JP, Coleman MC, Aunan ES, Walsh SA, Spitz DR, Kregel KC (2005) Aging reduces responsiveness to BSO- and heat stress-induced perturbations of glutathione and antioxidant enzymes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(4):R1035-41
89. Morton JP, Maclaren DP, Cable NT, Campbell IT, Evans L, Bongers T, Griffiths RD, Kayani AC, McArdle A, Drust B (2007) Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. *Acta Physiol (Oxf)* 190(4):319-27
90. Morrow JD (2005) Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(2):279-86
91. Morrow JD, Roberts LJ (1997) The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 36(1):1-21
92. Myhre LG, Robinson S (1977) Fluid shifts during thermal stress with and without fluid replacement. *J Appl Physiol* 42(2):252-6

93. Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Opiela SJ, Morrow JD (2002) Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J Appl Physiol* 92(5):1970-7
94. Nose H, Mack GW, Shi XR, Nadel ER (1988) Involvement of sodium retention hormones during rehydration in humans. *J Appl Physiol* 65:332–336
95. Nybo L, Jensen T, Nielsen B, González-Alonso J (2001) Effects of marked hyperthermia with and without dehydration on VO₂ kinetics during intense exercise. *J Appl Physiol* 90(3):1057-64
96. Oh-ishi S, Kizaki T, Nagasawa J, Izawa T, Komabayashi T, Nagata N, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H (1997) Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 326–332
97. Ohtsuka Y, Yabunaka N, Fujisawa H, Watanabe I, Agishi Y (1994) Effect of thermal stress on glutathione metabolism in human erythrocytes. *Eur J Appl Physiol Occup. Physiol* 68(1):87-91
98. Oztürk O, Gümüşlü S (2004) Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress. *Life Sci* 13;75(13):1551-65
99. Paik IY, Jeong MH, Jin HE, Kim YI, Suh AR, Cho SY, Roh HT, Jin CH, Suh SH (2009) Fluid replacement following dehydration reduces oxidative stress during recovery. *Biochem Biophys Res Commun* 22;383(1):103-7
100. Pinho RA, Silva LA, Pinho CA, Scheffer DL, Souza CT, Benetti M, Carvalho T, Dal-Pizzol F (2010) Oxidative Stress and Inflammatory Parameters After an Ironman Race. *Clin J Sport Med* 20(4):306-311

101. Pitts GC, Johnson RE, Consolazio FC (1944) Work in the heat as affected by intake of water, salt and glucose. *Am. J. Physiol* 142:253–259
102. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, Dudley G (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 266: R375–R380
103. Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88(4):1243-76
104. Praticò D, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA (2001) The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab* 12(6):243-7
105. Praticò D, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA (2004) F2-isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases. *Chem Phys Lipids*. 128(1-2):165-71
106. Pyke S, Lew H, Quintanilha A (1986) Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 30;139(3):926-31.
107. Racinais S, Gaoua N, Grantham J (2008) Hyperthermia impairs short-term memory and peripheral motor drive transmission. *J Physiol* 1;586(Pt 19):4751-62
108. Rådegran G (1997) Ultrasound Doppler estimates of femoral artery blood flow during dynamic knee extensor exercise in humans. *J Appl Physiol* 83(4):1383-8
109. Ramanathan, NL (1964) A new weighting system for mean surface temperature of the human body. *J Appl Physiol* 19:531-3
110. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS (1992) Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 73(5):1797-804

111. Rendell MS, Kelly ST, Bamisedun O, Luu T, Finney DA, Knox S (1993) The effect of increasing temperature on skin blood flow and red cell deformability. *Clin Physiol* 13(3):235-45
112. Roberts LJ, Morrow JD (2000) Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 15;28(4):505-13
113. Rowell LB (1974) Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiol Rev* 54(1):75-159
114. Sawka MN, Noakes TD (2007) Does dehydration impair exercise performance? *Med Sci Sports Exerc* 39(8):1209-17
115. Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Belló-Klein A, Oliveira AR (2005) Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol* 30(6):723-34
116. Schneider CD, Oliveira AR (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte* 10(4):308-313
117. Selkirk GA, McLellan TM, Wright HE, Rhind SG (2009) Expression of intracellular cytokines, HSP72, and apoptosis in monocyte subsets during exertional heat stress in trained and untrained individuals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(3):R575-86
118. Senay LC Jr (1970). Movement of water, protein and crystalloids between vascular and extra-vascular compartments in heat-exposed men during dehydration and following limited relief of dehydration. *J Physiol* 210(3):617-35
119. Senay LC Jr (1978) Early response of plasma contents on exposure of working men to heat. *J Appl Physiol* 44(2):166-70

120. Sen CK, Marin E, Kretzschmar M, Hänninen O (1992) Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol* 73(4):1265-72
121. Shibasaki M, Wilson TE, Crandall CG (2006) Neural control and mechanisms of eccrine sweating during heat stress and exercise. *J Appl Physiol* 100(5):1692-701
122. Shirreffs SM, Maughan RJ (1998) Urine osmolality and conductivity as indices of hydration status in athletes in the heat. *Med Sci Sports Exerc* 30:1598–1602
123. Sies H (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chemie, International Edition in English* 25:1058-1071
124. Supinski G, Nethery D, Murhez N, Ciufu R, DiMarco A (1996) Glutathione metabolic responses to loaded breathing: variation among respiratory muscles. *J Appl Physiol* (3): 1362-1369
125. Stafforini DM, Sheller JR, Blackwell TS, Sapirstein A, Yull FE, McIntyre TM, Bonventre JV, Prescott SM, Roberts LJ 2nd (2006) Release of free F2-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* 24;281(8):4616-23
126. Stephenson LA, Kolka MA (1988) Plasma volume during heat stress and exercise in women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57(4):373-81
127. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D (2009) Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med* 15;47(10):1371-4

128. Vincent HK, Powers SK, Demirel HA, Coombes JS, Naito H (1999) Exercise training protects against contraction-induced lipid peroxidation in the diaphragm. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 79:268–273
129. Werner J, Mekjavic IB, Taylor NAS (2008) Concepts in physiological regulation: a thermoregulatory perspective. In. Taylor NAS, Groeller H. *Physiological bases of human performance during work and exercise*. 1st Edition. Churchill Livingstone Elsevier.
130. Yu BP (1994) Cellular defense against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162
131. Zhao QL, Fujiwara Y, Kondo T (2006) Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia. *Free Radic Biol Med* 40(7):1131-43

ANEXOS

ANEXO

CARTA DE ACEITE DOUTORADO SANDUÍCHE



Brunel
UNIVERSITY
WEST LONDON

School of Sport & Education
Heinz Wolff Building
Uxbridge, Middlesex UB8 3PH,
UK

Uxbridge 11 December 2007

To Whom It May Concern:

We are delighted to accept Mr Orlando Laitano (PhD student at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul) as a visiting PhD student in the Centre for Sports Medicine and Human Performance (CSMHP), Brunel University (West London), during a period of a year starting in May 2008, during which he will perform the study entitled "Effect of exercise-induced dehydration on oxidative stress in humans". Orlando will be working closely with a post-doctoral fellow and a lecturer in preparing and carrying out this project. In attending our monthly Centre's seminar, Orlando will familiarise with the 3 areas of research of our Centre (i.e., cardiovascular physiology, respiratory physiology and biomechanics of human performance), have the opportunity to present and discuss his work in a constructive environment and start writing an article reporting the results. In so doing, Orlando will be able to improve tremendously his English proficiency. We therefore believe that obtaining this fellowship will help Orlando in developing his career as an independent scientist when returning to Brazil.

Should you request further information, please do not hesitate in contacting me.

Yours sincerely,

Professor José González-Alonso
Chair of Sport and Exercise Physiology
Director, Centre for Sports Medicine & Human Performance
School of Sport and Education
Brunel University
Uxbridge
Middlesex UB8 3PH
United Kingdom

Tel +44 (0) 1895 267324
Fax +44 (0) 1895 269769
E-mail j.gonzalez-alonso@brunel.ac.uk

ANEXO

CARTA DE CONCESSÃO DE BOLSA SANDUÍCHE CAPES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Ministério da Educação - Anexos I e II - 2º Andar
Caixa postal 365
70359-970 - Brasília, DF
Brasil



March 7, 2008

TO WHOM IT MAY CONCERN

I hereby certify that Mr./Mrs. **ORLANDO LAITANO LIONELLO NETO** has been awarded a scholarship from the Capes Foundation, an agency under the Ministry of Education of Brazil, in order to conduct part of his doctoral research as a visiting graduate student at **BRUNEL UNIVERSITY**.

The scholarship includes:

- . monthly stipends of L\$ 769,00;
- . a one-time settling-in allowance: L\$ 838,91;
- . one round-trip international air ticket:
PORTO ALEGRE (BR)/UXBRIDGE (UK)/PORTO ALEGRE (BR);

The scholarship is valid from **May/2008** to **April/2009**.

Maria Luiza de Santana Lombas
General Coordinator of Scholarships Abroad

Sandra Lopes Hugo de Jesus
Coordenadora Geral de Programas com o Exterior
Substituta
Port. Nº 22 de D.O.U. de 19/04/05

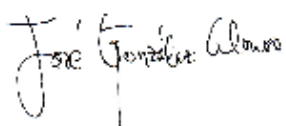
ANEXO

RELATÓRIO FINAL DE ORIENTADOR NO EXTERIOR

Clearly Orlando has demonstrated, during his stay at Brunel, that he possesses many of the fundamental qualities necessary to start a career as an independent researcher. An unquestionable proof of that is that he has recently won a lecturer position in Human Metabolism at the Universidade Federal do Vale do Sao Francisco in Petrolina, Brazil.

Should you have any queries, please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads "José González-Alonso". The signature is written in a cursive style with a large initial 'J'.

Professor José González-Alonso, PhD
Professor of Exercise Physiology
Director, Centre for Sports Medicine and Human Performance
School of Sport and Education
Brunel University
Uxbridge
Middlesex UB8 3PH
United Kingdom

Tel +44 1895 267324
Fax +44 1895 265376
E-mail j.gonzalez-alonso@brunel.ac.uk



Brunel
UNIVERSITY
WEST LONDON

Centre for Sports Medicine &
Human Performance
School of Sport & Education
Heinz Wolff Building
Uxbridge, Middlesex UB8 3PH,
UK

16th July 2009

Re: Final Report for the Brazilian National Research Foundation

To Whom It May Concern:

I would like to certify that Mr Orlando Laitano Lionello Neto has spent a very fruitful year as a visiting PhD student at the Brunel University Centre for Sports Medicine and Human Performance thanks to the support of the Brazilian National Research Foundation. During his stay Orlando has outperformed the original aim of completing one research project and improving his research and English language skills. Rather he has made noticeable improvements in a variety of skills while avidly completing two separate projects: one on *the effects of isolated hyperthermia on circulatory markers of oxidative stress* and the companion project on *the effects of dehydration and hyperthermia on oxidative stress across the resting and exercising leg*. He also played a major role in the grant won from the Brazilian National Science and Technology Research Council, led by his supervisor at the "Universidade Federal do Rio Grande do Sul Escola de Educação Física," Porto Alegre, Dr. Álvaro Reischak de Oliveira for a value of BRL 20.000. This grant has been very instrumental in partially covering the running and indirect costs of aforementioned projects.

During his stay, Orlando has carefully analysed and interpreted the results of both studies and has written a draft of a first paper. I anticipate that two original research articles will be published in international peer-review journals in the field of Exercise and Sports Medicine from these two studies. The publications will form the basis for his PhD to be completed within the next 2 years while back in Brazil. While in the UK, Orlando have attended 3 international conferences: The 2008 Physiological Society Annual Conference (Cambridge, UK), the 2008 Annual Congress of the European College of Sport Science (Estoril, Portugal) and the 2009 Annual Congress of the European College of Sport Science (Oslo, Norway). He eloquently presented the poster entitled "*Hyperthermia induces oxidative stress in resting but not in exercising humans*" in the latter conference. In addition, Orlando has participated in all our monthly seminar in which he demonstrated his good knowledge base of the field by frequently asking insightful questions and participating in the discussions.

ANEXO

QUESTIONÁRIO DE ESTADO DE SAÚDE APLICADO NOS ESTUDOS

PRE-PARTICIPATION HEALTH CHECK QUESTIONNAIRE

Health and safety within this investigation is of paramount importance. For this reason we need to be aware of your current health status before you begin any testing procedures. The questions below are designed to identify whether you are able to participate now or should obtain medial advice before undertaking this investigation. Whilst every care will be given to the best of the investigators ability, an individual must know his/her limitations.

Subject name:.....
 Date of birth:.....
 Doctors Surgery
 Address:.....
 Emergency Contact Name:.....

Please answer the following questions:		YES	NO
1.	Has your doctor ever diagnosed a heart condition or recommend only medically supervised exercise?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.	Do you suffer from chest pains, heart palpitations or tightness of the chest?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.	Do you have known high blood pressure? If yes, please give details (i.e. medication)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.	Do you have low blood pressure or often feel faint or have dizzy spells?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.	Do you have known hypercholesteremia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.	Have you ever had any bone or joint problems, which could be aggravated by physical activity?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.	Do you suffer from diabetes? If yes, are you insulin dependent?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8.	Do you suffer from any lung/chest problem, I.e. Asthma, bronchitis, emphysema?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.	Do you suffer from epilepsy? If yes, when was the last incident?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10.	Are you taking any medication?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11.	Have you had any injuries in the past? E.g. back problems or muscle, tendon or ligament strains, etc...	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12.	Are you currently enrolled in any other studies?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13.	I have already participated in a blood donation program	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14.	Are you a smoker?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15.	Do you exercise on a regular basis (at least 60min a week)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16.	Describe your exercise routines (mode, frequency, intensity/speed, race times):		

If you feel at all unwell because of a temporary illness such as a cold or fever please inform the investigator. Please note if your health status changes so that you would subsequently answer YES to any of the above questions, please notify the investigator immediately.

I have read and fully understand this questionnaire. I confirm that to the best of my knowledge, the answers are correct and accurate. I know of no reasons why I should not participate in physical activity and this investigation and I understand I will be taking part at my own risk.

Participant's name & signature: _____ Date: _____

Investigator's name & signature: _____ Date: _____

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Informed Consent Form

The participant should complete the whole of this sheet himself

*Please tick the
appropriate box*

YES NO

Have you read the Research Participant Information Sheet?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Have you had an opportunity to ask questions and discuss this study?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Have you received satisfactory answers to all your questions?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Who have you spoken to?		
Do you understand that you will not be referred to by name in any report concerning the study?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Do you understand that you are free to withdraw from the study:		
- at any time	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- without having to give a reason for withdrawing?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- <i>(where relevant)</i> without affecting your future employment as a member of staff of the University or your progression or assessment as a student of the University.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Do you agree to take part in this study?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Signature of Research Participant:

Date:

Name in capitals:

Witness statement

I am satisfied that the above-named has given informed consent.

Witnessed by:

Date:

Name in capitals:

ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO ESTUDO I

Head of School of Sport & Education
Professor Susan Capel

Brunel
UNIVERSITY
WEST LONDON

Heinz Wolff Building,
Brunel University, Uxbridge,
Middlesex, UB8 3PH, UK
Telephone +44 (0)1895 266494
Fax +44 (0)1895 269769
Web www.brunel.ac.uk

Orlando Laitano
c/o School of Sport and Education
Brunel University

8th October 2008

Dear Orlando

RE95-07 - The effects of passive hyperthermia on blood markers of exercise induced oxidative stress in humans

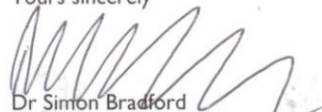
I am writing to confirm the Research Ethics Committee of the School of Sport and Education received your application connected to the above mentioned research study. Your application has been independently reviewed to ensure it complies with the University Research Ethics requirements and guidelines.

The Chair, acting under delegated authority, is satisfied with the decision reached by the independent reviewers and is pleased to confirm there is no objection on ethical grounds to the proposed study.

Any changes to the protocol contained within your application and any unforeseen ethical issues which arise during the conduct of your study must be notified to the Research Ethics Committee for further consideration.

On behalf of the Research Ethics Committee for the School of Sport and Education, I wish you every success with your study.

Yours sincerely



Dr Simon Bradford
Chair of Research Ethics Committee
School Of Sport and Education

ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO ESTUDO II

University Research Ethics Committee

11 September 2008

Proposer: Mr. James Pearson
Mr. Eric Stöhr
Centre for Sports Medicine & Human Performance
Heinz Wolff

Title: **The effects of graded dehydration and hyperthermia on the regulation of human skeletal muscle blood flow and cardiac function**

Dear Mr. Pearson and Mr. Stöhr,

The University Research Ethics Committee has considered the amendments recently submitted by you in response to the Committee's earlier review of the above application.

The Chair, acting under delegated authority, is satisfied that the amendments accord with the decision of the Committee and has agreed that there is no objection on ethical grounds to the proposed study.

Any changes to the protocol contained in your application, and any unforeseen ethical issues which arise during the project, must be notified to the Committee.
Kind regards,

David Anderson-Ford
Chair, Research Ethics Committee
Brunel University

ANEXO

ARTIGO EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY

Separate and combined effects of heat stress and exercise on circulatory markers of oxidative stress in euhydrated humans

Orlando Laitano · Kameljit Kaur Kalsi ·
Mark Pook · Alvaro Reischak Oliveira ·
José González-Alonso

Accepted: 5 July 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Combined heat stress, dehydration, and exercise is associated with enhanced oxidative stress in humans, but the separate and combined effects of heat stress and exercise on circulatory markers of oxidative stress without the influence of dehydration remain uncertain. The purpose of this study was to determine the effects of whole body heat stress alone and in combination with exercise on blood markers of oxidative stress in euhydrated humans. Eight males wore a water-perfused suit at rest and during 6 min of one-legged knee extensor exercise under control and heat stress conditions while maintaining euhydration. Following the control trial and a 15 min resting period, hot water was perfused through the suit in order to increase core, skin, and mean body temperatures by ~ 1 , ~ 6 , and $\sim 2^\circ\text{C}$, respectively. Blood samples were

taken to measure reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), superoxide dismutase (SOD) and plasma isoprostanes. Heat stress alone did not alter GSH, SOD activity, or plasma isoprostanes, but increased GSSG leading to a reduction in the GSH/GSSG ratio. No changes in these variables were observed with exercise alone. Conversely, combined heat stress and exercise increased both GSH and GSSG, decreased SOD activity, but did not alter GSH/GSSG ratio or isoprostanes. In conclusion, these findings suggest that heat stress, independently of dehydration, induces non-radical oxidative stress at rest but not during moderate exercise because an increase in antioxidant defense compensates the heat stress-induced non-radical oxidative stress.

Keywords Hyperthermia · Isoprostanes · Glutathione · Superoxide dismutase · Hydration

Communicated by Narihiko Kondo.

O. Laitano · K. K. Kalsi · J. González-Alonso (✉)
Centre for Sports Medicine and Human Performance,
Brunel University West London, Uxbridge,
Middlesex UB8 3PH, UK
e-mail: J.Gonzalez-Alonso@brunel.ac.uk

M. Pook
School of Health Science and Social Care,
Brunel University West London, Uxbridge, UK

O. Laitano · A. R. Oliveira
Exercise Research Laboratory, Federal University of Rio Grande
do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Present Address:

O. Laitano
Escola de Educação Física, Universidade Federal do Vale do São
Francisco, UNIVASF, Av. José de Sá Maniçoba, S/N, Centro,
56304-917 Petrolina, PE, Brazil
e-mail: Orlando.Laitano@univasf.edu.br

Introduction

The combination of heat stress, dehydration, and exercise imposes a severe stress in multiple physiological and regulatory systems (MacDougall et al. 1974; Kozlowski et al. 1985; González-Alonso et al. 1999, 2008; Racinais et al. 2008), which includes the equilibrium between oxidants and antioxidants cellular agents (McAnulty et al. 2005; Paik et al. 2009). An imbalance between pro and anti oxidant towards a more oxidizing environment is known as oxidative stress, which is thought to be involved in muscle soreness and damage during exercise (Finaud et al. 2006).

Heat stress-induced reactive oxygen species (ROS) formation may be an additional factor that induces molecular changes in DNA, proteins, lipids and other biological molecules, which contribute to oxidative stress

(Bruskov et al. 2002; Grasso et al. 2003; Zhao et al. 2006). Several studies have attempted to determine whether heat stress enhances oxidative stress in humans (McAnulty et al. 2005; Morton et al. 2007; Ohtsuka et al. 1994). Unfortunately, the results of these investigations cannot be examined solely in the context of heat stress because their research design did not control the participant's hydration level. In a recent study that manipulated the hydration status of exercising individuals it was shown that dehydration augmented oxidative damage (Paik et al. 2009). Although speculative, the mechanism by which dehydration enhances oxidative stress may involve alterations in shear stress caused by the increased blood viscosity (El-Sayed et al. 2005) and/or reduced peripheral blood flow including that to active skeletal muscle (González-Alonso et al. 1998). Furthermore, the study by McAnulty et al. (2005) showed that hyperthermia (rectal temperature of 39.5°C) also enhances oxidative stress in subjects exercising on a treadmill for 50 min in the heat, however, at the end of this protocol subjects were dehydrated by ~3% of the initial body mass. Therefore, it is difficult to assess whether heat stress alone increases oxidative stress during exercise. On the other hand, Morton et al. (2007) found that elevated core (38.9°C) and muscle temperature (39.5°C) did not cause oxidative stress in resting humans. This disparity of results may be due to the difficulty of isolating heat stress from dehydration, differences in the magnitude of heat stress, dehydration and experimental model as well as different markers of oxidative stress analyzed.

Aerobic cells possess two distinct types of antioxidants, preventative and free-radical chain breaking (Gohil et al. 1988). The antioxidant free-radical chain breaking enzyme superoxide dismutase (SOD) catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide (H₂O₂) and may aid recovery after exposure to oxidative stress (Halliwell and Gutteridge 2006). However, it is an important antioxidant defense mechanism in aerobic organisms it may be affected by increased body temperature (Oztürk and Gümsü 2004). The primary preventative antioxidant pathway for hydroperoxide removal involves the action of glutathione peroxidase that oxidizes glutathione (GSH) into glutathione disulfide (GSSG) in the cytosol and mitochondria (Jones 2008). However, in human erythrocytes which contain no mitochondria, these antioxidant enzymes are present in the cytoplasm and work in concert to remove inorganic and organic hydroperoxides (Inayama et al. 2002). In addition, erythrocytes are continuously exposed to high concentrations of oxygen and iron in hemoglobin and these factors make erythrocytes very sensitive to oxidative injury (Bernabucci et al. 2002) making them an appropriate model to study oxidative stress (Kusmic et al. 2000). Recently, a study (Veskoukis et al. 2009) showed that

GSH and GSSG measured in erythrocytes correlate well with the concentration found in skeletal muscle. Reductions in the GSH/GSSG ratio indicate non-radical induced oxidative stress as the stress is caused by redox imbalance rather than structural damage such as lipid peroxidation, DNA and/or protein damage (Ferreira and Reid 2008; Jones 2008). Another marker of exercise-induced oxidative stress is the presence of isoprostanes, which are products of the free radicals-induced peroxidation of phospholipids and reflect the extent of oxidative stress induced lipid peroxidation (Nieman et al. 2002). Nonetheless, the separate and combined effects of heat stress and exercise on these circulatory markers of oxidative stress in euhydrated humans have never been systematically evaluated.

Therefore, the aim of this study was to determine the effects of heat stress alone and in combination with exercise upon oxidative stress in euhydrated humans by measuring whole blood glutathione (GSH and GSSG) metabolism, erythrocyte SOD activity, and plasma isoprostanes as markers of oxidative stress at rest and during submaximal one-legged knee extensor exercise.

Materials and methods

Participants

Eight healthy recreationally active males (age 26 ± 2 years, height 176 ± 0.8 cm and body weight 78 ± 3 kg) were recruited. Participants visited the laboratory twice. The study protocol was approved by the Brunel University Research Ethics Committee and all participants gave informed consent after being informed about the risks and benefits involved in the experiment. All procedures conformed to the code of Ethics of the Medical Association (Declaration of Helsinki).

Preliminary visit

During the first visit, height and weight were recorded and a familiarization session was undertaken on the one legged knee-extensor ergometer with a light workload of 5 W for 6 min. Thereafter, an incremental one-legged knee extensor exercise test until exhaustion was performed to determine the exercise intensity for the main experimental visit. The exercise intensity was determined to ensure that all participants performed the same relative work during the main trial. Initial work rate was set at 10 W and increased 10 W/min (at a cadence of 70–80 rpm) resulting in a WR_{max} of 50 ± 3 W. Participants were not under any type of antioxidants supplementation and were advised to refrain from heavy exercise, ingestion of caffeine or

alcohol for at least 12 h before the main trial and the intake of antioxidants 1 week before the experiment.

Main trial

On the second visit, upon arrival, participants self inserted a rectal probe, which was placed 10 cm in the rectal passage. Thereafter, pre-body mass was recorded (SECA Ltd, Birmingham, UK), surface skin thermistor probes were attached to the skin surface at six locations (chest, upper back, lower back, abdomen, thigh, calf) and connected to a Squirrel Data Logger acquisition system (Grant Instruments, Cambridge, UK) to determine weighted mean skin temperature (Ramanathan 1964). Mean body temperature (MBT) was estimated using the following formula: $MBT = 0.8 \times T_{Core} + 0.2 \times T_{Skin}$ (Hardy and Dubois 1937). A heart rate telemetry band (Polar Inc, Washington, NY, USA) was positioned around the participant's chest. Participants were dressed in a custom built water-perfused suit that was interwoven with silicone tubing and connected to a water circulator (Julabo F34, Seelbach, Germany). The water circulator was fitted with an auxiliary pump and a temperature control unit capable of controlling the temperature of the water in the suit, which covered the subject's entire body except their head, hands and feet. A cannula was inserted into an antecubital vein while the participants rested for 15 min. A baseline blood sample (rest control) was taken before subjects performed a 6-min one-legged knee extensor exercise at 50% of their pre-determined maximal workload. A second blood sample was taken at the fifth minute of exercise (exercise control). Following 15 min recovery, water was perfused through the suit at $\sim 48^{\circ}\text{C}$. To minimize heat loss during the heating protocol, the torso was covered with a thermal foil blanket, socks covered both feet and a woollen hat was worn on the head. Subjects underwent a passive heat stress protocol to elevate core and skin temperatures by ~ 1 and $\sim 6^{\circ}\text{C}$, respectively. After reaching the target increase in body temperature (~ 75 min), a blood sample was taken (rest heat stress) and participants performed a second bout of 6-min one-legged knee extensor exercise and another blood sample was taken after fifth minute of exercise (exercise heat stress). Heart rate, rectal temperature and skin temperature were recorded throughout the whole protocol. To isolate the effects of heat stress (without dehydration), subjects were kept euhydrated by ingesting ~ 1.5 L of warm ($\sim 38^{\circ}\text{C}$) water throughout the heat stress protocol.

Blood preparation

Blood samples (10 mL) were drawn into a syringe, divided into five 2 mL aliquots in K2-EDTA tubes and kept on ice. One aliquot was kept as whole blood for further

determination of reduced and oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG). For GSH, 50 μL of whole blood was added to the bottom of a centrifuge tube and frozen for later analysis. For GSSG, 100 μL of the whole blood was added to a centrifuge tube containing 10 μL of 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethane-sulfonate (M2VP) to prevent the participation of the reduced form in the enzymatic assay without inhibiting glutathione reductase activity, and immediately placed in liquid nitrogen. The remaining aliquot of the whole blood was centrifuged at 1,000g for 10 min at 4°C for plasma separation. One mL of plasma was added to a centrifuge tube containing 10 μL of 0.005% butylated hydroxytoluene (BHT) for further analysis of isoprostanes. The buffy coat separating the erythrocytes from the plasma containing mainly white blood cells was removed and discarded. An aliquot of red blood cells for the determination of SOD activity was lysed with 1:4 (v/v) ice-cold ultra pure water and centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C . The supernatant (erythrocyte lysate) was removed and stored for further determination of total erythrocyte SOD activity. The remaining 2 mL of blood was used to analyse hemoglobin in duplicate using the cyanmethemoglobin method, and packed-cell volume was determined in quadruplicate by microcentrifugation to estimate changes in plasma volume, as described by Dill and Costill (1974).

Indexes of oxidative stress

GSH was determined using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), which reacts with GSH to form a spectrophotometrically detectable product at 412 nm (Calbiochem, Nottingham, UK). The assay kit was developed for the whole blood determination of reduced and oxidised glutathione. GSSG was determined by the reduction of GSSG to GSH using DTNB. SOD activity was measured using tetrazolium salt for the detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine, the absorbance was read at 450 nm after a 20 min incubation period (Calbiochem, Nottingham, UK). One unit of SOD was defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. Free plasma isoprostanes were measured by an enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Estonia). Briefly, the assay is based on the competition between 8-isoprostane and an 8-isoprostane-acetylcholinesterase conjugate for a limited number of 8-isoprostane-specific rabbit antiserum binding sites.

Statistical analysis

Normality of data was first assessed using the Shapiro-Wilk test. Data are presented as mean \pm SEM unless otherwise stated. To identify differences in normally

distributed results, two-way repeated measures analyses of variance were employed. Where a significant interaction was apparent, pairwise differences were evaluated using Tukey's post hoc procedure and paired *t* tests with Holm–Bonferroni adjustment for multiple comparisons. Whenever data were found to be non-parametric, the pairwise differences were assessed using the Wilcoxon matched-pair signed-rank test. For the purpose of hypothesis testing, the 95% level of confidence was predetermined as the minimum criterion to denote a statistical difference ($p < 0.05$). All data analyses were undertaken using SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Body temperatures and hydration status

In control condition, rectal and skin temperature remained unchanged during exercise compared to rest (Table 1). With heat stress, resting rectal and skin temperatures increased by ~ 1 and $\sim 6^\circ\text{C}$, respectively, compared to control rest ($p < 0.05$) and remained unchanged during exercise. Thus, mean body temperature was 1.9 – 2.0°C higher during heat stress compared to control conditions both at rest and during exercise. Body mass did not change throughout the trial (75.8 ± 3.5 vs. 75.8 ± 3.5 kg, $p = 0.736$). Although hematocrit (Htc) ($p = 0.092$) and hemoglobin (Hb) ($p = 0.298$) were not affected throughout the protocol, estimated changes in plasma and blood volumes were detected (Table 1). Exercise alone increased heart rate by 29 ± 5.5 bpm ($p = 0.030$) whereas heat stress increased it by 47 ± 7.3 bpm at rest ($p < 0.001$) and 59 ± 7.3 bpm ($p < 0.001$) during exercise (Table 1).

Effect of exercise alone

The one-legged knee extensor exercise performed without heat stress did not change either GSH or GSSG, as a result GSH/GSSG ratio did not change (rest = 127 ± 32 ; exercise = 108 ± 27 , $p = 0.334$). Erythrocyte SOD activity (rest = 0.0679 ± 0.009 ; exercise = 0.0811 ± 0.009 U/mL, $p = 0.208$) and free plasma isoprostanes (rest = 13.0 ± 3.5 ; exercise = 12.6 ± 3.4 pg/mL, $p = 0.674$) also remained unchanged. Plasma and blood volumes did not decline significantly with exercise alone ($p > 0.05$) (Table 1).

Effect of heat stress alone

At rest, heat stress did not alter GSH (620 ± 109 vs. 693 ± 143 μM , $p = 0.093$), but increased GSSG (5.7 ± 1.3 vs. 12.3 ± 3.2 μM , $p = 0.012$ compared to rest control), thereby leading to a significant reduction in the GSH/GSSG ratio (127 ± 31.6 vs. 64 ± 19.2 μM , $p = 0.017$). Neither erythrocyte SOD activity (0.068 ± 0.009 vs. 0.076 ± 0.006 U/mL, $p = 0.205$) nor free plasma isoprostanes (13 ± 3.5 vs. 14.4 ± 3.9 pg/mL, $p = 0.161$) were affected by heat stress at rest. Heat stress alone induced reductions in plasma and blood volumes ($p < 0.05$) when compared to rest control but were not different from exercise control ($p > 0.05$) (Table 1).

Effect of combined heat stress and exercise

When combined with exercise, heat stress increased both GSH (569 ± 118 vs. 821 ± 166 μM , $p = 0.036$) and GSSG (6 ± 1.1 vs. 16 ± 6.6 μM , $p = 0.012$) compared to exercise control. Consequently, GSH/GSSG ratio did not change (108 ± 27 vs. 88 ± 25 , $p = 0.208$) (Fig. 1).

Table 1 Hemodynamic, hydration, and temperatures response to heat stress and exercise

	Control		Heat Stress	
	Rest	Exercise	Rest	Exercise
Heart rate (bpm)	57.6 ± 3.8	$86.4 \pm 5.5^\#$	$104.8 \pm 7.3^\#$	$145.8 \pm 7.3^*$
Htc (%)	42.4 ± 0.7	42.9 ± 0.7	43.5 ± 0.7	44.8 ± 0.6
Hb (g/dL)	13.9 ± 0.2	14.3 ± 0.4	14.8 ± 0.1	14.8 ± 0.3
Plasma volume (%)	0 ± 0	-3.4 ± 1.7	$-7.9 \pm 1.7^\#$	$-9.8 \pm 1.6^\#*$
Blood volume (%)	0 ± 0	-2.4 ± 1.4	$-5.9 \pm 1.4^\#$	$-5.8 \pm 1.0^\#$
Skin temperature ($^\circ\text{C}$)	33.1 ± 0.5	33.1 ± 0.5	$39.0 \pm 0.3^\#*$	$38.7 \pm 0.3^\#*$
Rectal temperature ($^\circ\text{C}$)	37.0 ± 0.1	37.0 ± 0.1	$38.1 \pm 0.1^\#*$	$38.3 \pm 0.2^\#*$
Mean body temperature ($^\circ\text{C}$)	36.3 ± 0.1	36.3 ± 0.1	$38.2 \pm 0.1^\#*$	$38.3 \pm 0.2^\#*$
Body mass (kg)	75.8 ± 3.5	–	–	75.8 ± 3.5

Heart rate, hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), plasma and blood volumes at rest and exercise under control condition and with heat stress. Exercise values were recorded at the fifth minute after the onset of the one-legged knee-extensor exercise bouts. Values are mean \pm SEM for eight subjects

* Significantly different from exercise control

Significantly different from rest control

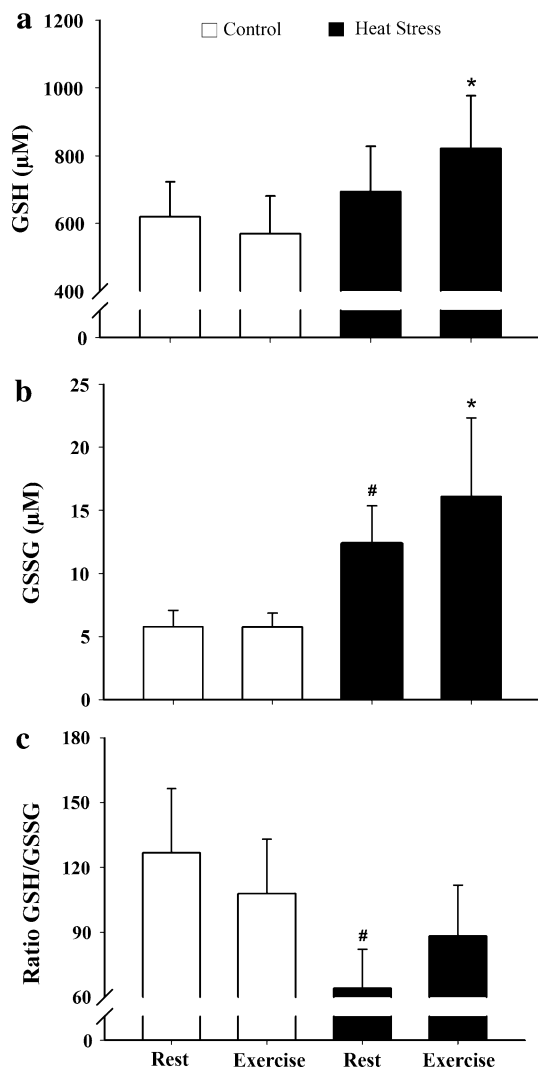


Fig. 1 The effect of whole body heat stress on blood GSH (a), GSSG (b), and ratio (c) at rest and during exercise. Data are mean \pm SEM values for eight subjects. *Significantly different from exercise control. #Significantly different from rest control ($p < 0.05$)

Erythrocyte SOD activity decreased during exercise with heat stress (0.081 ± 0.009 vs. 0.070 ± 0.007 , $p = 0.036$) (Fig. 2) whereas free plasma isoprostanes did not change (12.5 ± 3.4 vs. 15 ± 3.7 pg/mL, $p = 0.327$). Combined heat stress and exercise also induced reductions in plasma volume when compared to both rest and exercise control ($p < 0.05$) but was not different from heat stress at rest ($p > 0.05$). Reduction in blood volume was only different from rest control ($p < 0.05$) when heat stress and exercise were combined (Table 1).

Discussion

The main finding of the present study was that whole body heat stress, independent of dehydration, induced non-

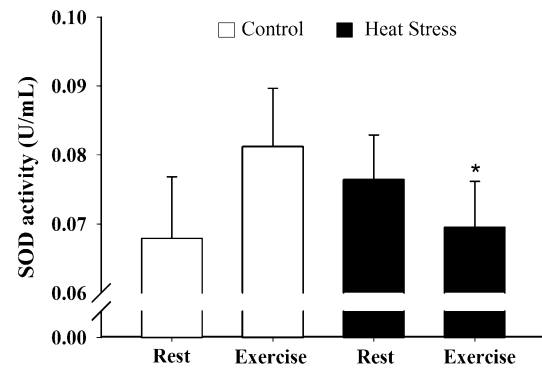


Fig. 2 The effect of whole body heat stress on erythrocyte SOD activity at rest and during exercise. Data are mean \pm SEM values for eight subjects. *Significantly different from exercise control ($p < 0.05$)

radical oxidative stress at rest but not during moderate intensity isolated muscle mass exercise because a parallel increase in antioxidant defense compensates for the heat stress induced oxidative stress. To our knowledge this is the first study to measure the effects of heat stress, independent of dehydration, on circulatory markers of oxidative stress in resting and exercising humans. Previous studies have reported the effects of heat stress on oxidative stress in animal models (Mitchell and Russo 1983; Bernabucci et al. 2002; Oztürk and Gümlü 2004; Zhao et al. 2006). However, studies that have determined these effects in humans either had the confounding factor of dehydration (Ohtsuka et al. 1994; McAnulty et al. 2005) or did not measure oxidative stress during exercise (Ohtsuka et al. 1994; Morton et al. 2007).

The redox state present within cells has been suggested as a key component of gene expression, as well as cell function, and that chronic deregulation of such a balance in favor of a more oxidizing environment is associated with non-radical induced oxidative stress (Fisher-Wellman and Bloomer 2009; Jones 2008). GSSG accumulates as a result of GSH oxidation due to the removal of hydroperoxides by the activity of the enzyme glutathione peroxidase (Gohil et al. 1988). In the present study, heat stress increased blood GSSG both at rest and during exercise. One possible explanation for the increase in GSSG at rest might be the enhanced catecholamine autooxidation, as heat stress at rest is associated with an increase in noradrenalin spillover into the circulation (González-Alonso and Calbet 2003) and its oxidation may form free radicals (Supinski et al. 1996). In contrast, exercise is also related with an increase in catecholamine release (Bailey et al. 2004) but exercise alone in the present study did not cause GSH oxidation. A study using the one-legged knee extensor exercise at 70% of peak power output resulted in a noradrenalin concentration of 2.73 nmol/L (Bailey et al. 2004) whereas heat stress at rest in another study resulted in a concentration of 5.4 nmol/L

(González-Alonso and Calbet 2003). One could speculate that the exercise type (isolated leg kicking) and intensity (50% of maximal peak power output) was not sufficient to induce significant release of catecholamine in the absence of heat stress and, therefore, oxidation of GSH was not observed. Furthermore, during exercise, our results are supported by other studies that provided evidence that combined submaximal exercise and heat stress induce GSH oxidation (Gohil et al. 1988; Inayama et al. 2002; Ohtsuka et al. 1994).

With regards to GSH, heat stress did not affect blood GSH concentration at rest, but increased GSH concentration during exercise. An increase in GSH content is associated with a greater preventative antioxidant defense as it serves as a substrate to the enzyme glutathione peroxidase in order to scavenge organics and inorganics hydroperoxides (Halliwell and Gutteridge 2006). Evidence for this is provided by a heat stress study in humans where subjects were immersed in a hot bath (42°C) induced oxidative stress by increasing total GSH concentration and glutathione peroxidase activity (Ohtsuka et al. 1994). However, in the aforementioned study (Ohtsuka et al. 1994), no exercise was performed and core temperature was not reported. Therefore, the mechanism by which a combination of exercise and heat stress increases GSH concentration remains unclear. However, it is likely that exercise performed at higher body temperatures would increase the enzyme glutathione reductase activity and, therefore, contribute to the increased formation of GSH by the inter-conversion between GSH and GSSG to confer transient thermal protection (Mitchell and Russo 1983). Also, another explanation could be the interorgan transport of GSH as it is known to be exported in large quantities by the liver and released into blood during oxidative stress where they are transported by the erythrocytes (Meister 1988). Organs that use GSH such as the liver normally break GSH by a γ -glutamyl transpeptidase reaction and transport the precursor amino acids into the cells for resynthesis of GSH (Ji and Fu 1992) resulting in an increased concentration of GSH.

The exercise protocol alone (e.g. without heat stress) did not affect the redox balance. There is a lack of studies reporting the effects of one-legged knee extensor exercise upon GSH metabolism and there may be issues regarding whether this is a good exercise model to study oxidative stress. However, one study (Bailey et al. 2004) used the one-legged knee extensor exercise and measured free radical adducts using the spin trap technique. Although they found that one-legged knee extensor enhanced free radical formation, they did not measure GSH metabolism. It, therefore, seems that even though free radicals may be generated acutely during this type of exercise, the redox balance remains unchanged at least when heat stress is absent. The one-legged knee extensor exercise uses the

quadriceps which is a large muscle group capable of inducing marked elevation in the cardiovascular demand (Andersen et al. 1985). In the present study, heart rate was elevated by ~ 30 bpm with exercise alone and by ~ 40 bpm when heat stress was combined with exercise. This roughly corresponds to 75% of participants' maximal predicted heart rate and this intensity is comparable to a moderate intensity exercise. A more stressful exercise model (e.g. treadmill running or intense cycling) may have been used instead of one legged knee extensor exercise. However, for the present study design where participants performed both conditions on the same day, a more stressful exercise model would have caused considerable carry-over effect between the control and heat stress conditions. Moreover, there are many studies demonstrating the oxidative response to more stressful types of exercise on oxidative stress, whereas only a few studies use moderate intensity exercise. It, therefore, reinforces an interesting finding of the present study which was that in spite of the moderate intensity and short duration of the exercise performed, when heat stress was superimposed, important changes in the antioxidant status took place and avoided the heat stress-induced blood redox imbalance.

Considering our results, heat stress decreased the GSH/GSSG ratio at rest but not during exercise. Reductions in the GSH/GSSG ratio indicate non-radical induced oxidative stress as the stress is caused by redox imbalance rather than structural damage such as, lipid peroxidation, DNA and/or protein damage (Ferreira and Reid 2008; Jones 2008) which is in agreement with our findings of unchanged plasma isoprostanes concentration. Notwithstanding, during exercise, the skeletal muscle is thought to be the main source of free radicals generation (Bailey et al. 2004) and, therefore, measuring the oxidative status within the muscle would provide a more sensitive background about the intramuscular redox balance. However, in the present study, GSH and GSSG were measured in the whole blood. As the amount of GSH and GSSG in plasma is negligible (Gohil et al. 1988) the results herein described are from erythrocyte cells and has been shown to be strongly correlated to the redox balance of skeletal muscle (Veskoukis et al. 2009). Nevertheless, in this aforementioned study this correlation was not tested in humans during exercise and the results showed that GSH and GSSG concentration in blood correlate well with the skeletal muscle content but the GSH/GSSG ratio does not and the explanation for this surprising finding is not provided. Therefore, a more invasive technique involving muscle biopsies would have to be carried out to certify this relationship.

To ensure that the present GSH and GSSG findings were not the result of a residual effect of exercise per se, two participants performed a time course trial on a separate occasion where blood samples were taken before exercise,

during the fifth minute of one legged knee extensor exercise then 15, 30 and every 30 min for 2 h followed by every 60 min for up to 4 h of passive recovery. The results showed that there was a slight decrease in GSH and increase in GSSG values during the first 15 min of recovery which returned to baseline levels 30 min after exercise and remained constant for the remaining 3.5 h. Since the heat stress condition was performed 90 min after the exercise control condition, it is reasonable to conclude that the changes in glutathione metabolism observed in the present study are largely the result of heat stress rather than a carry-over effect from the exercise (control).

Even though body mass was tightly controlled by providing plain water during the experiment resulting in no significant change to hematocrit and hemoglobin, reductions in plasma volume were observed as a result of heat stress alone and in combination with exercise. These reductions in intravascular fluids are likely the result of fluid shifts to interstitial and intracellular fluid compartments due to exercise as well as the ingestion of plain water during heat stress exposure. In support of this, we found in a parallel study from our group (unpublished data) that plasma and blood volumes were well maintained when ingesting a carbohydrate–electrolyte solution throughout the heat stress protocol. We chose not to use a carbohydrate–electrolyte solution in the present study because it has been shown to affect the antioxidant defense and thus could have had an impact on our findings (Fernández et al. 2009). Although a study directly assessing the effects of heat stress and exercise on oxidative stress in subjects kept euhydrated and normovolemic by ingesting an isotonic solution containing no carbohydrate is warranted, our estimates indicate that the reductions in plasma volume in the present study only accounted for a small part ($\leq 10\%$) of the observed increases in GSH and GSSG concentrations with heat stress alone and with the combination of heat stress and exercise. While the observed reductions in plasma volume do not alter the conclusions of the study, we acknowledge that lower plasma volume may be involved in the mechanism underlying the elevations in GSSG and GSH with combined heat stress and exercise.

Our results suggest that heat stress does not change SOD enzyme activity at rest but reduces SOD activity during exercise. The activation of SOD is usually caused by increased superoxide radical formation (Ji 1993). SOD is a free radical-chain breaking enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide radical into oxygen and H_2O_2 (Halliwell and Chirico 1993), and while it is an important antioxidant defense mechanism in aerobic organisms it can be affected by changes in temperature, as demonstrated by previous studies using animal models (Oztürk and Gümüslü 2004; Morrison et al. 2005). In the present study, SOD activity was not affected by heat stress at rest but was

reduced when heat stress was superimposed with exercise. This would reflect a decreased free radical chain-breaking antioxidant defense due to the inactivation of SOD activity induced by the combination of heat stress and exercise. With exercise alone there was a tendency for the activity of SOD to be increased, although this was not statistically significant because of the great inter-subject variability in the control trial, as a result the decrease in SOD activity seen with the combination of exercise and heat stress was probably an attenuation of the increase in the enzyme activity induced by exercise. However, the precise mechanism by which SOD activity is attenuated by heat stress during exercise in heat stressed euhydrated subjects warrants further investigation.

In the present study, plasma isoprostanes were not affected by heat stress both at rest and during exercise. However, a previous study has reported increased plasma isoprostanes concentration in humans exercising on a treadmill (50% of VO_{2max}) in the heat (McAnulty et al. 2005). The reasons for this conflicting result could be the type and duration of exercise, the hydration status and the degree of increase in core temperature observed in the studies. Also, the increased preventative antioxidant defense provided by GSH observed in the present study when heat stress and exercise were superimposed could protect the cells from lipid peroxidation and, therefore, would result in no changes in plasma isoprostanes.

In summary, this study showed that heat stress alone, independent of dehydration, induces non-radical oxidative stress at rest but not during moderate short-duration exercise because an increase in GSH compensates for the hyperthermia induced oxidative stress in euhydrated humans. These findings imply that heat stress alone may be a stimulus for oxidative stress at rest whereas in combination with moderate short duration exercise it enhances the antioxidant defense avoiding the redox imbalance and probably preventing cellular structural damage.

Acknowledgments We would like to thank Mr. Steven Trangmar, Dr. James Pearson, and Dr. David Low for their technical support. Orlando Laitano was supported by a scholarship from CAPES (Brazilian Educational Ministry—BEX 0323/08-0). The study was supported by the Brazilian Science and Technology Ministry (Edital MCT/CNPq 14/2008—Universal—473557/2008-8) and partially supported by the Gatorade Sports Science Institute. The authors declare that they have no competing interests.

References

- Andersen P, Adams RP, Sjogaard G, Thorboe A, Saltin B (1985) Dynamic knee extensor exercise as model for study of isolated exercising muscle in humans. *J Appl Physiol* 59(5):1647–1653
- Bailey DM, Young IS, McEneny J, Lawrenson L, Kim J, Barden J, Richardson RS (2004) Regulation of free radical outflow from an

- isolated muscle bed in exercising humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(4):H1689–H1699
- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A (2002) Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J Dairy Sci* 85(9):2173–2179
- Bruskov VI, Malakhova LV, Masalimov ZK, Chernikov AV (2002) Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* 30(6):1354–1363
- Dill DB, Costill DL (1974) Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37(2):247–248
- El-Sayed MS, Ali N, El-Sayed Ali Z (2005) Haemorrhology in exercise and training. *Sports Med* 35(8):649–670
- Fernández JM, Da Silva-Grigoletto ME, Gómez-Puerto JR, Viana-Montaner BH, Tasset-Cuevas I, Túnez I, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F (2009) A dose of fructose induces oxidative stress during endurance and strength exercise. *J Sports Sci* 27(12):1323–1334
- Ferreira LF, Reid MB (2008) Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *J Appl Physiol* 104(3):853–860
- Finlaud J, Lac G, Filaire E (2006) Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36(4):327–358
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ (2009) Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 13:8–11
- Gohil K, Viguie C, Stanley WC, Brooks GA, Packer L (1988) Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 64(1):115–119
- González-Alonso J, Calbet JA (2003) Reductions in systemic and skeletal muscle blood flow and oxygen delivery limit maximal aerobic capacity in humans. *Circulation* 107(6):824–830
- González-Alonso J, Calbet JA, Nielsen B (1998) Muscle blood flow is reduced with dehydration during prolonged exercise in humans. *J Physiol* 15(513):895–905
- González-Alonso J, Teller C, Andersen SL, Jensen FB, Hyldig T, Nielsen B (1999) Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. *J Appl Physiol* 86(3):1032–1039
- González-Alonso J, Crandall CG, Johnson JM (2008) The cardiovascular challenge of exercising in the heat. *J Physiol* 586(1):45–53
- Grasso S, Scifo C, Cardile V, Gulino R, Renis M (2003) Adaptive responses to the stress induced by hyperthermia or hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Exp Biol Med* (Maywood) 228(5):491–498
- Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57(5 Suppl):715S–724S
- Halliwell B, Gutteridge J (2006) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford Bioscience, Boston
- Hardy JD, Dubois EF (1937) Regulation of heat loss from the human body. *Proc Natl Acad Sci USA* 23(12):624–631
- Inayama T, Oka J, Kashiba M, Saito M, Higuchi M, Umegaki K, Yamamoto Y, Matsuda M (2002) Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols. *Life Sci* 70(17):2039–2046
- Ji LL (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* 25(2):225–231
- Ji LL, Fu R (1992) Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* 72(2):549–554
- Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295(4):C849–C868
- Kozłowski S, Brzezińska Z, Kruk B, Kaciuba-Uściłko H, Greenleaf JE, Nazar K (1985) Exercise hyperthermia as a factor limiting physical performance: temperature effect on muscle metabolism. *J Appl Physiol* 59(3):766–773
- Kusmic C, Picano E, Busceti CL, Petersen C, Barsacchi R (2000) The antioxidant drug dipyrindamole spares the vitamin E and thiols in red blood cells after oxidative stress. *Cardiovasc Res* 47(3):510–514
- MacDougall JD, Reddan WGW, Layton CR, Dempsey JA (1974) Effects of metabolic hyperthermia on performance during heavy prolonged exercise. *J Appl Physiol* 36(5):538–544
- McAnulty SR, McAnulty L, Pascoe DD, Gropper SS, Keith RE, Morrow JD, Gladden LB (2005) Hyperthermia increases exercise-induced oxidative stress. *Int J Sports Med* 26(3):188–192
- Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263:17205–17208
- Mitchell JB, Russo A (1983) Thiols, thiol depletion, and thermosensitivity. *Radiat Res* 95(3):471–485
- Morrison JP, Coleman MC, Aunan ES, Walsh SA, Spitz DR, Kregel KC (2005) Aging reduces responsiveness to BSO- and heat stress-induced perturbations of glutathione and antioxidant enzymes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(4):R1035–R1041
- Morton JP, Maclaren DP, Cable NT, Campbell IT, Evans L, Bongers T, Griffiths RD, Kayani AC, McArdle A, Drust B (2007) Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. *Acta Physiol (Oxf)* 190(4):319–327
- Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Opiela SJ, Morrow JD (2002) Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J Appl Physiol* 92(5):1970–1977
- Ohtsuka Y, Yabunaka N, Fujisawa H, Watanabe I, Agishi Y (1994) Effect of thermal stress on glutathione metabolism in human erythrocytes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 68(1):87–91
- Oztürk O, Gümüşlü S (2004) Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress. *Life Sci* 75(13):1551–1565
- Paik IY, Jeong MH, Jin HE, Kim YI, Suh AR, Cho SY, Roh HT, Jin CH, Suh SH (2009) Fluid replacement following dehydration reduces oxidative stress during recovery. *Biochem Biophys Res Commun* 383(1):103–107
- Racinais S, Gaoua N, Grantham J (2008) Hyperthermia impairs short-term memory and peripheral motor drive transmission. *J Physiol* 586(Pt 19):4751–4762
- Ramanathan NL (1964) A new weighting system for mean surface temperature of the human body. *J Appl Physiol* 19:531–533
- Supinski G, Nethery D, Murhez N, Ciuffo R, DiMarco A (1996) Glutathione metabolic responses to loaded breathing: variation among respiratory muscles. *J Appl Physiol* 3:1362–1369
- Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D (2009) Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med* 47(10):1371–1374
- Zhao QL, Fujiwara Y, Kondo T (2006) Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia. *Free Radic Biol Med* 40(7):1131–1143