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

# EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAFEÍNA SOBRE BIOMARCADORES SALIVARES E PLASMÁTICOS EM CICLISTAS E PRATICANTES DE SPINNING DURANTE TESTE INCREMENTAL NO CICLOERGÔMETRO.

**KARINA ESTELA COSTA**

**UBERLÂNDIA-MG**
**2006**

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

# EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAFEÍNA SOBRE BIOMARCADORES SALIVARES E PLASMÁTICOS EM CICLISTAS E PRATICANTES DE SPINNING DURANTE TESTE INCREMENTAL NO CICLOERGÔMETRO.

**ALUNA: Karina Estela Costa**
**ORIENTADOR: Foued Salmen Espíndola**

**UBERLÂNDIA-MG**
**2006**

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

# EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAFEÍNA SOBRE BIOMARCADORES SALIVARES E PLASMÁTICOS EM CICLISTAS E PRATICANTES DE SPINNING DURANTE TESTE INCREMENTAL NO CICLOERGÔMETRO.

**ALUNA: Karina Estela Costa**
**ORIENTADOR: Foued Salmen Espíndola**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos Requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica**

**UBERLÂNDIA-MG**
**2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

C837e Costa, Karina Estela, 1979

Efeito da suplementação de cafeína sobre biomarcadores salivares e plasmáticos em ciclistas e praticantes de spinning durante teste incremental no cicloergômetro / Karina Estela Costa. - Uberlândia, 2006.

68 f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III.Título.

CDU: 612.766.1

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

# EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAFEÍNA SOBRE BIOMARCADORES SALIVARES E PLASMÁTICOS EM CICLISTAS E PRATICANTES DE SPINNING DURANTE TESTE INCREMENTAL NO CICLOERGÔMETRO.

**ALUNA: KARINA ESTELA COSTA**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**PRESIDENTE: Foued Salmen Espindola**

**EXAMINADORES:**

**Luis Cláudio Cameron**

**Maria Inês Homsi Brandeburgo**

**DATA DA DEFESA: 27/02/2006**

**As sugestões da comissão examinadora e as normas da PGGB para o formato da dissertação foram contempladas**

_____-

**(Foued Salmen Espindola)**

Uberlândia,_____/_____/_____

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela dádiva da vida e do aprendizado. Aos meus pais, Élio e Zilda, pelo apoio e compreensão, e as minhas irmãs, Kate e Kelly, pela dedicação e carinho (além dos empréstimos de dinheiro).

Aos grandes mestres que tive nessa jornada: pessoas que me mostraram pela chama do exemplo vivo o caminho que não devo trilhar, e pessoas que pela graça da amizade me mostraram o sentido e a importância do apoio mútuo.

Ao meu orientador Foued Salmen Espíndola pela oportunidade de crescimento.

A FAPEMIG pela ajuda financeira, tanto para desenvolvimento do projeto geral de biomarcadores salivares do exercício, quanto pela bolsa cedida para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Aos voluntários que cederem um espaço do seu tempo para realizarem os testes.

Ao professor Guilherme Di agostini por tão gentilmente ceder o Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Educação Física.

Ao laboratório de Imunologia pelo leitor de placas e as dúvidas esclarecidas sobre óxido nítrico.

Aos companheiros de jornada e laboratório que tanto me ajudaram. A minha turma de mestrado, Renata, Gabriel, Leonardo, Rogério, “Vicentim”, Vinícius, dentre outros mais....

Em especial ao grupo de Bioquímica do Exercício, Ismair, Romeu, Miguel, Vanessa, Aníbal, Vívian, Karen, Carol. Sem vocês seria meio que impossível chegar até aqui.

Aos meus tantos amigos que mesmo de longe me apoiaram. A minha amiga Gisele e minha prima michele pelos ouvidos e conselhos. A minha amiga Fernanda Carolina, pelos primeiros passos em algumas dosagens, e a minha amiga Joice, pela tão preciosa ajuda nas coletas e na preparação dos testes. Ao Guilherme Puga pela ajuda com o lactato. Ao meu amicíssimo do peito Rodrigo Dias que se foi antes de me ver chegar até aqui (tenho certeza que estaria muito feliz por mim).

**De tudo tiro só uma lição:**

**A humildade é sempre o melhor caminho, e por mais que eu conheça só terei uma grande certeza na vida, de que “só sei que nada sei”.**

## Lista de abreviaturas

---

| | |
|---|---|
| **NO** | **óxido nítrico** |
| **ATP** | **adenosina trifostato** |
| **ADP** | **adenosina difosfato** |
| **AMP** | **adenosina monofosfato** |
| **Pi** | **fosfato** |
| **PFK-1** | **fosfofrutoquinase** |
| **NADH** | **nicotinamida adenina dinucleotídeo** |
| **AT** | **limar anaeróbico** |
| **IAT** | **limiar anaeróbico individual** |
| **NOS** | **óxido nítrico sintase** |
| **eNOS** | **óxido nítrico sintase endotelial** |
| **nNOS** | **óxido nítrico sintase neuronal** |
| **iNOS** | **óxido nítrico sintase induzível** |
| **FAD** | **flavina adenina dinucleotídeo** |
| **FMN** | **flavina mononucleotídeo** |
| **$H_4B$** | **tetrahidrobiopterina** |
| **NOHA** | **N-hidroxi- L-arginina** |
| **sGC** | **guanilato ciclase solúvel** |
| **GTP** | **guanosina trifosfato** |
| **cGMP** | **guanosina monofosfato cíclico** |
| **mRNA** | **RNA mensageiro** |
| **cAMP** | **adenina monofosfato cíclico** |

## SUMÁRIO


Agradecimentos ..... 6
Lista de abreviaturas ..... 8
Resumo geral ..... 11
Introdução Geral ..... 15
Limiar de Lactato ..... 16
Óxido Nítrico e Exercício ..... 18
Síntese de Óxido Nítrico e Enzimas ..... 19
Efeitos do Óxido Nítrico ..... 20
Treinamento ..... 21
atrito de cisalhamento ..... 24
Cafeína ..... 25
Estrutura química: ..... 25
Como a cafeína atua no organismo ..... 27
Doses ótimas: ..... 30
Referência bibliográfica ..... 31
Efeitos da ingestão de cafeína na taxa de biomarcadores salivares, no lactato plasmático e no desempenho físico. ..... 42
resumo ..... 42
abstract ..... 43
Introdução ..... 44
Materiais e métodos ..... 46
Análise Estatística ..... 49
Resultados ..... 49
Frequência cardíaca ..... 49
Proteínas totais repouso e exaustão ..... 50
Proteínas totais durante o exercício, Lactato plasmático e Limiares anaeróbicos (AT e PAT) ..... 50
Óxido nítrico ..... 51
Desempenho físico ..... 51
Discussão: ..... 52

Gráficos ..... 57
Figura 1 – curva de esforço AT e PAT..... 57
Figura 2 – Correlação AT e PAT ..... 58
Legendas ..... 60
Referência Bibliográfica ..... 61
Conclusão geral..... 66
anexos..... 67
1. Termo de consentimento livre ..... 67
2. Coleta de saliva no teste ergométrico ..... 68
3. Análise de óxido nítrico na saliva ..... 70
4. Análise de proteína ..... 73

## RESUMO GERAL

A saliva é constituída principalmente de água, além de conter também constituintes orgânicos e inorgânicos. O controle da secreção salivar é mediado por uma ação combinada de estímulos simpáticos e parassimpáticos, onde o sistema adrenérgico atua primariamente na secreção de proteínas e o colinérgico na regulação da secreção de eletrólitos e água. O exercício físico pode induzir alterações na concentração, atividade e composição de vários componentes salivares, tais como, proteínas, óxido nítrico, amilase e eletrólitos. O limiar anaeróbico foi definido como sendo o ponto no qual há um aumento não linear tendendo a exponencial na concentração de lactato sanguíneo. Alguns estudos mostraram uma correlação entre o limiar anaeróbico de lactato e o limiar salivar (TSA), onde aumentos na concentração de $\alpha$-amilase, eletrólitos e proteínas totais ocorrem acima dos níveis basais durante o exercício. O NO é uma molécula gasosa muito reativa, que é produzida pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima promove a deaminação do aminoácido L-arginina produzindo L-citrulina e NO, o qual pode atuar como mediador endógeno do tônus vascular, agente da resposta imune e neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso central e periférico. Vários agentes e estímulos, como a bradicinina, acetilcolina e o atrito de cisalhamento (*shear stress)*, são capazes de promover a liberação de NO. Eles atuam aumentando o influxo de cálcio para o interior das células endoteliais, resultando na ativação da NOS e na produção de NO. O atrito de cisalhamento, em especial, se dá pelo aumento do fluxo e da viscosidade sanguínea no vaso, e como os outros estímulos e agentes, eleva a concentração de cálcio intraendotelial promovendo a liberação de NO. Este por sua vez, se difunde então para as células endoteliais subjacentes, nas quais ativa a enzima guanilato ciclase, a qual produz GMP cíclico a partir de GTP, e desencadeia assim, o processo de vasodilatação. Técnicas histoquímicas e resultados funcionais têm sugerido que o NO possui um papel excitatório na regulação dos nervos parassimpáticos, induzindo a secreção salivar na glândula submandibular de ratos. A saliva humana contém níveis relativamente altos de óxido nítrico e sua dosagem é efetuada a partir de seus metabólitos, nitrito e nitrato. O método mais utilizado nas dosagens de NO é o de Griess, no qual a absorbância dos

produtos gerados na reação do nitrito com uma amina aromática primária é mensurado e comparado com uma curva de referência. A cafeína é uma substância ergogênica popular entre os atletas, e a sua ingestão como suplemento é realizada com o propósito de aumentar a “performance” física. Uma das hipóteses para esse aumento na performance, causada pela ingestão de cafeína, é que ela atua na mobilização de ácidos graxos livres, e economiza assim, o glicogênio usado por músculos ativos. Outra hipótese seria a inibição dos receptores de adenosina a partir da similaridade com a molécula de adenosina. Entretanto, não se sabe ao certo o mecanismo preciso de atuação da cafeína na melhoraria do desempenho físico. Os benefícios ergogênicos da cafeína podem ser influenciados pela dose, intensidade, tipo de exercício, uso prévio de cafeína, status de treinamento e variação da resposta individual a suplementação. O pico plasmático da concentração da cafeína é de aproximadamente 1 hora.Nosso estudo verificou o efeito da ingestão aguda de cafeína (5mg/kg), uma hora antes de um teste incremental no cicloergômetro, até exaustão voluntária. Observamos que essa substância melhorou o desempenho físico, atuando como ergogênico, aumentou as concentrações de proteínas totais e óxido nítrico na saliva, e não alterou as concentrações de lactato sanguíneo.

Palavras-chaves: saliva, exercício, limiar anaeróbico, óxido nítrico, cafeína.

**General abstract**

The saliva is constituted mainly of water, besides containing also constituent organic and inorganic. The control of the saliva secretion is mediated by a combined action sympathetic and parasympathetic, where the system adrenergic acts primarily in the proteins secretion and the colinergic in the electrolytes and water regulation. The physical exercise can induce alterations in the concentration, activity and composition of several saliva components, such as, proteins, nitric oxide (NO), amilase and electrolytes. The anaerobic threshold was defined as being the point in which there is an increase no lineal tending the exponential in the blood lactate concentration. Some studies showed a correlation between the lactate anaerobic threshold and the saliva threshold (TSA), where increases in the amilase, electrolytes and total proteins concentration happen above the basal levels during the exercise. The NO a gaseous molecule reactivates, that it is produced by nitric oxide synthase (NOS). This enzyme promotes the L-arginina deamination producing L-citrulina and NO, which can act as endogenous mediator of the vascular tones, agent of the immune response and neurotransmissor or neuromodulador in the central and peripheral nervous system. Several agents and stimulus, as the bradicinina, acetilcolina and the shear stress are capable to promote the NO liberation. They act increasing the calcium influx for the endothelial cells, resulting in the NOS activation and NO production. The shear stress is the increase of the blood flow viscosity in the vessel, and as the other stimulus and agents, it elevates the intraendothelial calcium concentration promoting NO liberation. This is diffused then for the underlying endoteliais cells, in which it activates the enzyme guanylate cyclase, which produces cyclical GMP starting from GTP, and it unchains like this, the vasodilation process. Histochemical and functional results have suggested that nitric oxide (NO) palys an excitatory role in the regulation of parassympathetic nerve inducing salivary secretion in the submandibular gland of rats. The human saliva contains levels relatively high of nitric oxide and his dosage is made starting from their metabolites, nitrito and nitrate. The method more used in the dosages of NO is the one of Griess, in which the absorbance of the products generated in the reaction of the nitrito with a primary aromatic amina is measured and compared

with a reference curve. The caffeine is a popular ergogenic substance among the athletes, and her ingestion as supplement is accomplished with the purpose of increasing the physical "performance." One of the hypotheses for that increase in the performance, caused by the caffeine ingestion, it is that she acts in the mobilization of fat, and it spare the glycogen used by active muscles. Another hypothesis would be the inhibition of the adenosina receptors starting from the similarity with the adenosina molecule. However, the mechanism to delay fatigue remais elusive. The ergogenics benefits of the caffeine can be influenced by the dose, intensity, exercise type, previous use of caffeine, training status and variation of the respnse individual after suplementation. The plasma concentration of the caffeine approximate a maximum level in 1 hour. Our study verified the effect of the single dose of caffeine (5mg/kg), one hour before a incremental exercise test in the cycle ergometer, even voluntary exhaustion. We observed that the caffeine ingestion improved the physical acting, acting as ergogenic, it increased the saliva nitric oxide and total proteins concentrations, and it didn't alter the blood lactate concentrations.

Key words: saliva, exercise, anaerobic threshold, nitric oxide, caffeine.

## INTRODUÇÃO GERAL

A saliva é constituída predominantemente por água (97-99,5%) originada do plasma presente na célula acinar (YOUNG E VAN LENNEP, 1979), além de conter também uma grande proporção de constituintes orgânicos e inorgânicos (CHICHARRO et al., 1998). As funções da saliva são lubrificação, digestão, formação de barreira semipermeável bioativa que recobre a superfície oral e regula a composição da flora oral (PRAKOBPHOL et al., 2000).

O volume do fluido translocado a cada dia através das glândulas salivares se aproxima de 750 ml. Isto representa aproximadamente 20% do total do volume plasmático (SCHENEYER, YOUNG E SCHENEYER, 1972). As glândulas parótidas, submandibulares, e sublinguais são responsáveis pela maior parte da produção salivar; sendo auxiliadas por glândulas salivares menores. A contribuição relativa de cada tipo de glândula na secreção da saliva não estimulada é em média de 65% para a submandibular, 23% da parótida, 4% da sublingual e 8% das glândulas salivares menores (DAWES, 1974). Essas glândulas são estruturas tubuloalveolares formadas por uma região acinar, que é responsável pela secreção do fluido e da maioria das proteínas exócrinas (85%), e por uma região ductal, que transporta a saliva da região acinar para a cavidade oral (YOUNG E VAN LENNEP, 1979).

O controle da secreção salivar é mediado por uma ação combinada de estímulos simpáticos e parassimpáticos (EMMELIN, 1987). A inervação parassimpática provoca vasodilatação, o que aumenta a quantidade e a fluidez da saliva contendo baixos níveis de compostos orgânicos e inorgânicos. A inervação simpática provoca vasoconstrição, o que confere um baixo volume do fluxo salivar, porém contém elevados níveis de proteínas, especialmente α-amilase, e compostos inorgânicos. Este estímulo faz com que a saliva se torne mais viscosa (SCHNEYER, 1976; DENNIS E YOUNG, 1978).

A secreção salivar é regulada por arco reflexo. Este consiste de receptores e nervos aferentes, conexão central e nervos, e receptores eferentes agindo nas glândulas salivares. Estes estímulos quando mediados por quimiorreceptores (ex:.

goma de mascar) nos pontos de gustação e, mecanorreceptores (ex:. goma de mascar e tablete de parafina) no ligamento periodontal, representam a maioria da produção aferente Isto leva a uma despolarização neural e a um aumento da taxa de fluxo salivar (JENSEN et al., 1998).

A salivação pode ser não estimulada e estimulada. A primeira seria a saliva coletada sem nenhuma fonte aparente de estímulos gustatórios, mastigatório, ou mecânicos**.** Esta é dependente da composição e do fluxo, da natureza e da duração da excitação, e do tamanho das glândulas. Já a segunda, seria a saliva que sofre influência de vários fatores, onde o grau de hidratação seria um dos fatores mais importante, seguido da exposição à luz, de estímulos gustatórios, mastigatórios e olfatórios, do posicionamento do corpo**,** das estações do ano e do ritmo circadiano (NAVAZESH, 1993).

Além das várias funções já atribuídas à saliva, estudos (CHICHARRO, 1998; WALSH, 1999) têm demonstrado que biomarcadores do esforço físico seriam encontrados na saliva. Os biomarcadores salivares, bem como os plasmáticos, são preceptores da capacidade anaeróbica, sendo que os salivares correspondem com precisão aos marcadores fisiológicos, oferecendo vantagens, como: coleta fácil e não invasiva, podendo ser realizada com mais freqüência e menos stress dos voluntários (SHIRTCLIFF *et al*., 2001). A análise desses biomarcadores tais como, óxido nítrico (NO), $\alpha$-amilase, lactato, proteínas totais é uma alternativa para o monitoramento do exercício físico.

**LIMIAR DE LACTATO**

O limiar de lactato foi definido por Wasserman (1986) como sendo o ponto no qual há um aumento não linear tendendo a exponencial na concentração de lactato sanguíneo. Existem diversos métodos de determinação desse limiar utilizando este biomarcador, dentre os quais está o "Limiar Anaeróbio Individual" (IAT) (STEGMANN, KINDERMANN E SCHNABEL, 1981), o lacmin e o Vel4mM. O IAT é determinado em testes de cargas progressivas com estágios de três minutos de duração e dosagem de lactato sanguíneo, onde o AT é determinado

de acordo com a cinética do lactato durante o exercício e a recuperação (STEGMANN, KINDERMANN E SCHNABEL,1981); o Lacmin é determinado considerando-se a intensidade do exercício correspondente ao menor valor de lactato, durante teste progressivo realizado após indução da "acidose lática"(TEGTBUR et al.,1993); e o Vel4mM, onde o indivíduo avaliado é submetido a um teste de cargas progressivas, composto no mínimo de dois estágios de pelo menos 4 minutos cada, e a velocidade correspondente à concentração fixa de 4mmol.$l^{-1}$ de lactato é determinada por interpolação entre a velocidade de corrida e a concentração de lactato sanguíneo ao final de cada estágio (CHICHARRO E ARCE, 1991).

Simões et al (1998), compararam esses três métodos de determinação do limiar de lactato citados acima, em fundistas; e tentaram correlacioná-los ao limiar de glicose. Neste estudo concluíram que todos os três métodos eram capazes de predizer com confiança o limiar anaeróbico; e que somente o Vel4mM não apresentou correlação com o limiar a partir da glicose.

A correlação do limiar de lactato com outras substâncias tem sido muito estudada. Limiares anaeróbicos salivares (CHICHARRO et al,1994; CALVO et al.,1997; BORTOLINI et al., 2005) vêm sendo propostos nos últimos anos. Chicharro e cols (1994) apontaram o limiar salivar (TSA) como sendo o ponto no qual os níveis de eletrólitos como Na e Cl, sofrem o primeiro aumento contínuo durante o exercício. Calvo e cols (1997) detectaram que o limiar salivar poderia também ser analisado a partir da concentração de amilase. Este seria o ponto no qual o primeiro aumento contínuo na concentração de amilase salivar ocorreria durante o exercício. Esses autores apontaram que o limiar de lactato e o salivar sofrem aumentos tendendo a exponencial no mesmo ponto. Os dois limiares podem se correlacionar, já que o limiar de lactato pode ser avaliado por meio da concentração de amilase salivar e eletrólitos durante o esforço físico (CALVO et al.,1997).

## ÓXIDO NÍTRICO E EXERCÍCIO

O endotélio vascular é um tecido dinâmico capaz de responder a estímulos físicos e químicos, a partir da síntese e liberação de inúmeros agentes (LUSHER, 1994; RUSH, TURK e LAUGHLIN, 2003). O óxido nítrico (NO) é uma das substâncias sintetizadas e liberadas, a partir da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS). A bioatividade do NO é determinada pela sua síntese e degradação, bem como pela sensibilidade do tecido alvo a essa substância (RUSH, TURK e LAUGHLIN, 2003). O exercício físico foi associado com a elevação nos níveis de NO e com uma redução na morbidade e mortalidade cardiovascular (KINGWELL, 2000). Uma maior adaptação vascular é observada durante o treinamento, onde há um aumento da expressão da isofoma eNOS nas células endoteliais (SESSA et al., 1994).

Adaptações endoteliais foram relatadas em animais como cães, ratos e suínos (SESSA et al., 1994; WOODMAN et al., 1997; DAVIS et al., 2003). Em humanos, o treinamento aumenta a vasodilatação dependente do endotélio, bem como os níveis de nitrito e nitrato plasmáticos, os quais são metabólitos da oxidação do NO (MAEDA et al., 2001; DAVIS et al., 2003).

Uma redução na liberação e bioviabilidade do NO, ou seja, uma redução na sua taxa de produção, um aumento na sua taxa de destruição a partir da interação com outras moléculas e, uma diminuição da sensibilidade da vasculatura lisa ao NO (GRAHAM e RUSH, 2004), estão associadas a doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes. Estes efeitos podem ser próprios da baixa ativação da NOS ou de uma redução no shear stress (atrito de cisalhamento) (Kingwell, 2000). Então, a regulação positiva da NOS, em resposta ao exercício físico pode elucidar, em partes, os seus efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares ou crônico-degenerativas.

**Síntese de Óxido Nítrico e Enzimas**

O óxido nítrico é gerado a partir da oxidação de cinco elétrons de um nitrogênio guanidino quimicamente equivalente, do aminoácido L-arginina. A enzima que atua nessa conversão é a óxido nítrico sintase (NOS) e os produtos finais dessa metabolização são o NO e a L-citrulina (CONNER e GRISHAM, 1995) (Figura 1).

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) está subdividida em três classes, a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS). Todas as isoformas possuem o mesmo mecanismo catalítico, operando com os mesmos cofatores e grupos prostéticos. São hemeproteínas e requerem oxigênio e NADPH como co-substrato, L-arginina como substrato, além de conterem flavina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahidrobiopterina (H4B). Essas enzimas são também consideradas monooxigenadas, já que no processo de hidroxilação da L-arginina ativam o oxigênio molecular e incorporam um de seus átomos em um intermediário da reação, o NOHA (SIGEL e SIGEL, 1999).

As enzimas neuronal e endotelial são constitutivas, ou seja, estão integradas no sistema e os seus níveis podem variar em resposta à variedade de eventos fisiológicos; já a induzível, pode ser expressa em altos níveis durante uma resposta imune (SIGEL e SIGEL, 1999). A enzima induzível é regulada geneticamente e requer muitas horas para ser expressa. A produção de NO atinge níveis máximos 24horas após a indução e então decresce dramaticamente (NUSSLER et al., 1993). O pico de produção de RNA mensageiro (mRNA) precede o pico de produção de NO por 16 horas, e declina durante o período de produção máxima de NO (GELLER et al., 1993).

A eNOS e a nNOS são reguladas pelos níveis de cálcio. A calmodulina é uma proteína ligante de cálcio que funciona essencialmente como uma subunidade presente na enzima. Quando o fluxo de cálcio aumenta na célula ocorre uma ativação de ambas as enzimas, via complexo cálcio/calmodulina, onde o cálcio liga-se a calmodulina, ativando a eNOS e a nNOS, permitindo o *turnover* da enzima e a produção de NO. A calmodulina também está presente,

como subunidade, na enzima induzível, porém sua ativação por cálcio não se faz necessário para que a enzima exerça sua atividade (SIGEL e SIGEL, 1999).

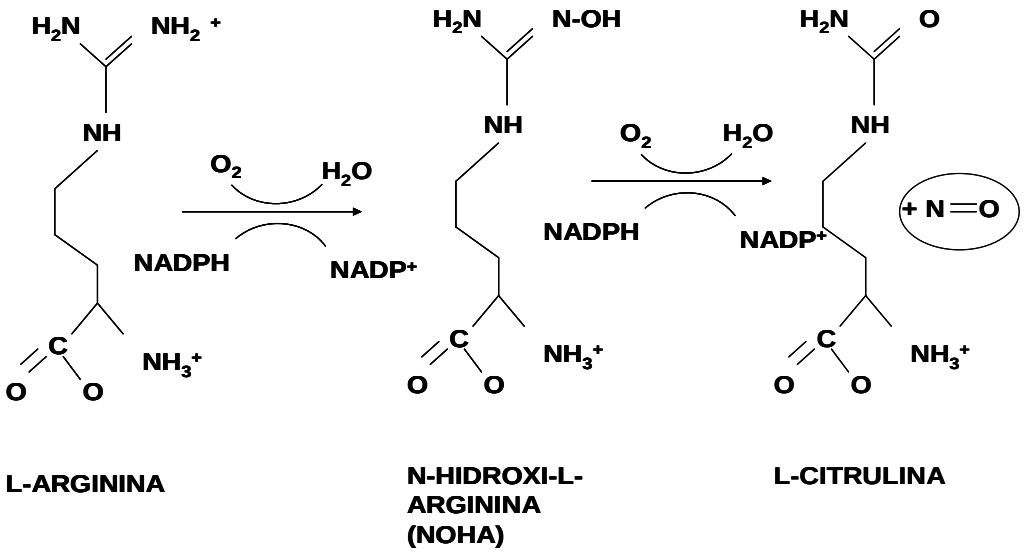



FIGURA 1 – formação de óxido nítrico, a partir da L-arginina, pela ação da óxido nítrico sintase (NOS) (CONNER e GRISHAM, 1995).

## Efeitos do Óxido Nítrico

Os efeitos vasodilatadores, eliciados pelo NO, são próprios de sua interação com a enzima solúvel guanilato ciclase (sGC). A guanilato ciclase é uma hemeproteína que catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) para o segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclico (cGMP) e, é a ação desse composto que direciona a dilatação do músculo liso. A sGC possui uma baixa atividade basal, entretanto quando é exposta ao NO a sua atividade pode aumentar em até 200 vezes (SIGEL e SIGEL, 1999).

Alguns agentes e estímulos são capazes de promover a liberação do NO. Dentre eles, encontram-se a bradicinina, acetilcolina e o atrito de cisalhamento (*shear stress*). Quando a acetilcolina é liberada pelos nervos autônomos, na parede dos vasos sanguíneos, ela induz as células endoteliais a produzirem e

liberarem NO, relaxando assim as células do músculo liso (ALBERTS et al., 1994). Todos os agentes e estímulos, que estão associados com a liberação do NO, aumentam os níveis de cálcio intracelular e ativam assim, as enzimas constitutivas (figura 3).

**Treinamento**

O exercício físico regular está associado com mudanças benéficas na pressão sanguínea, no metabolismo lipídico, no metabolismo da glicose, em fatores neurohormonais, no peso corporal e no *shear stress (*ARAKAWA, 1993). Os processos pelos quais estes benefícios ocorrem não estão totalmente esclarecidos. Um dos mecanismos, muito especulado nos últimos tempos, seria o aumento na produção do NO, juntamente com o aumento na expressão do gene da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), bem como a angiogênese induzida pelo fator de crescimento do endotélio, advindos com o treinamento.

Durante um esforço físico, os níveis de nitrato, nitrito e cGMP excretados na urina são elevados (KINGWELL, 2000). Husain (2003) reportou que ratos submetidos a oito semanas de treinamento, na esteira, apresentaram um aumento significativo nos níveis de NO plasmático, e assim mantiveram funções cardiovasculares regularizadas, tais como, pressão sanguínea e taxa de batimentos cardíacos (batimentos/minutos). Outro fator importante observado no estudo de Husain (2003), foi uma queda de aproximadamente 75% nos níveis de lactato plasmático após essas oito semanas de treinamento, quando comparado com o grupo controle. Nesse mesmo estudo a administração de L-NAME, um análogo competitivo da L-arginina, causou uma depressão significativa nos níveis de NO plasmático (84% do controle) e uma elevação também significativa nos níveis de lactato (123% do controle). Entretanto, o treinamento normalizou os níveis de NO plasmático e o de lactato, mesmo com a administração de L-NAME.

Miyauchi e colaboradores (2002), reportaram que o treinamento afetava a expressão da eNOS, de acordo com as mudanças na taxa do fluxo sanguíneo. No

pulmão, onde o fluxo sanguíneo era aumentado durante o exercício, a expressão da eNOS também aumentava, e nos rins, onde o fluxo sanguíneo diminuía, a expressão da eNOS também diminuía.

Sessa e colaboradores (1994) reportaram um aumento significativo nos níveis da eNOS, da aorta de cachorros, submetidos a 10 dias de treinamento aeróbico. Entretanto, Rush, Turk e Laughlin (2003), não observaram diferenças significativas nos níveis dessa enzima em aorta de porcos, submetidos a 12 semanas de treinamento aeróbico. Mas, por outro lado, observaram adaptações, como um menor índice de estresse oxidativo, o que preserva a bioatividade do NO e contribui para melhoras em funções endoteliais e cardiovasculares. As discrepâncias entre os resultados obtidos provavelmente são devidas à diferença no tempo e no protocolo de treinamento utilizado.

De acordo com Higashi e colaboradores (1999) um programa de treinamento por 12 semanas, de intenso a moderado, melhorou a vasodilatação dependente do endotélio com acetilcolina; e exercício de longa duração de intenso a moderado, aumentou a vasodilatação do endotélio em sujeitos saudáveis e hipertensos. Goto e colaboradores (2003) mostraram que 12 semanas de exercício moderado na bicicleta ergométrica, provocou um aumento na vasodilatação dependente do endotélio, aumentando o fluxo sanguíneo em resposta à acetilcolina, a partir da elevação nos níveis de NO, em sujeitos saudáveis. Entretanto, exercício de baixa e alta intensidade não alteraram as respostas do fluxo sanguíneo à acetilcolina.

A busca, através do exercício físico, por regularizações de funções cardiovasculares, torna-se cada vez mais constante. O treinamento melhora a dilatação dependente do endotélio e aumenta a expressão da óxido nítrico sintase (NOS). O exercício físico então, regula a síntese de NO por vários processos e, promove adaptações vasculares benéficas, já que exerce muitas ações anti-aterogênicas, via vasodilatação, bem como uma inibição da agregação de plaquetas, proliferação das células do músculo liso e adesão dos leucócitos nas células das paredes dos vasos (FUKAI, 2000).

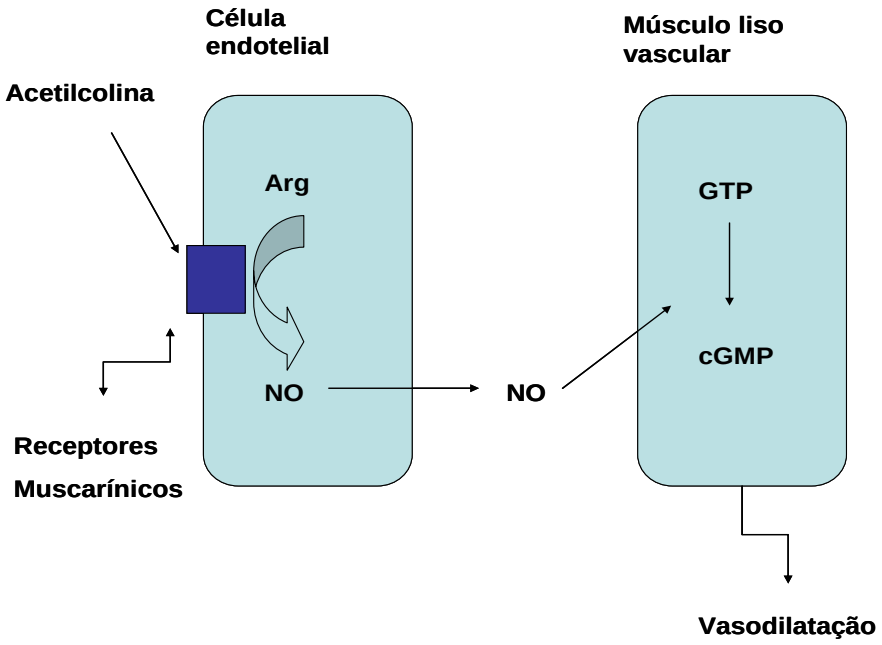



FIGURA 2 - O NO difunde-se para células do músculo liso e eleva os níveis do segundo mensageiro cGMP, promovendo assim a vasodilatação.

Disfunções endoteliais são associadas com doenças cardiovasculares, onde condições de patologias severas como hipertensão, aterosclerose e diabetes são associadas a uma baixa bioatividade do NO.

O exercício físico regular vem sendo relacionado com a recuperação ou normalização de funções endoteliais, onde os níveis de NO plasmático são elevados e a concentração de lactato decrescida (HUSAIN, 2003). Esse decréscimo na concentração nos níveis de lactato plasmáticos com o treinamento físico, provavelmente está associado com o aumento no consumo de oxigênio pelo músculo esquelético. Quando o consumo de oxigênio é aumentado, tem-se, por conseguinte, uma utilização mais ativa do metabolismo aeróbico, onde o desvio para a produção de lactato fica menos ativo, ou melhor, necessita-se de um tempo maior para que essa via se torne predominante na obtenção de energia, durante o exercício físico.

Embora se tenha postulado que o decréscimo na pressão sanguínea, em agentes vasoconstrictores e um aumento no *shear stress* pode contribuir para a vasodilatação dependente do endotélio, o mecanismo pelo qual o treinamento aeróbico regular melhora a disfunção endotelial, permanece desconhecido (GOTO et al., 2003). O NO como um potente vasodilatador torna-se uma peça fundamental nesse processo.

Assim, a partir dos dados encontrados na literatura, podemos dizer que apesar das pequenas diferenças entre os estudos pesquisados, que o treinamento físico promove um aumento na capacidade funcional e atua na proteção do sistema cardiovascular. O óxido nítrico, como um vasodilatador, melhora a distribuição sanguínea, fornecendo uma quantidade maior de oxigênio e substratos às células, o que se torna altamente benéfico para a vasculatura como um todo.

## ATRITO DE CISALHAMENTO

O atrito cisalhamento, ou *shear stress* é o atrito que o sangue faz na parede dos vasos sanguíneos. Os efeitos benéficos na vasculatura, advindos desse mecanismo, se dão através da ativação de muitos caminhos sinalizantes (TRAUB E BERK, 1998). Mecanossensores encontrados na membrana das células endoteliais, como receptores ligados à proteína G (TSENG et al., 1995), canais de íons (SCHWARTZ E LECHENE, 1992), e integrinas (MULLER et al., 1997) se sensibilizam com o shear stress e, transmitem os estímulos bioquímicos ativando proteínas como RAS/RAF/MEK/ERK (TRAUB E BERK, 1998) e a tirosina kinase c-Src (DAVIS et al., 2003), direcionando para um aumento na atividade da eNOS.

Takeshita e colaboradores (2000), reportaram que *shear stress* laminar a níveis fisiológicos (20 dynes/cm$^2$) induziu uma regulação sustentada na expressão e na atividade enzimática da GPx-1, em células endoteliais. Entretanto baixos níveis de *shear stress* (5 dynes/cm$^2$) não promoveram efeitos benéficos. Davis,

Cai e Harrison (2001), reportaram que o *shear stress* aumentava os níveis de mRNA da eNOS por dois caminhos: controlando e estabilizando a transcrição da enzima, sendo que ambos requeriam a ativação da tirosina kinase c-Src. Davis et al., 2003 analisaram os efeitos de três semanas de treinamento em ratos knockout da tirosina quinase c-Src (c-Src $^{+}$ / $^{-}$) e em ratos tipo selvagem. Os ratos c-Src $^{+}$ / $^{-}$ eram fenotipicamente normais, porém continham menos que a metade da soma das proteínas c-Src aórticas, quando comparados com os ratos tipo selvagem. Os ratos tipo selvagem apresentaram um aumento significativo na eNOS, a qual influenciava a expressão da ecSOD, já os ratos knockout não apresentaram aumento na expressão da eNOS e da ecSOD.

Então, aumentos na produção vascular de NO, pode ser resultado de um aumento no *shear stress* ou do aumento na expressão do gene da NOS endotelial.

## CAFEÍNA

### Estrutura química:

Quimicamente a cafeína é uma trimetilxantina, onde grupos metilas substituem hidrogênios ligados a nitrogênios no anel da xantina (fig 3). No organismo a xantina é um produto de quebra de duas bases purínicas, adenina e guanina, constituintes chaves do DNA e RNA. A adenina também é a base da molécula de ATP (adenina trifosfato) e do segundo mensageiro cAMP (fig4).

A cafeína é metabolizada (desmetilada) no fígado pelo sistema de enzimas citocromo P450 (GRAHAM, 2001), conhecidas como 1A2 (ou CYP1A2). Os primeiros produtos do metabolismo da cafeína são dimetilxantinas: paraxantinas (84% 1,7-dimetilxantina), teobromina (12% 3,7-dimetilxantina), e teofilina (4% 1,3-dimetilxantina). Em humanos o maior produto da degradação da cafeína é a paraxantina. A teofilina relaxa a musculatura lisa dos brônquios e por isso tem sido usada no tratamento de asma. As metilxantinas agem como antagonistas

não seletivas dos receptores de adenosina e, em vitro a ação da teofilina como antagonista dos receptores de adenosina é mais potente do que a própria cafeína (BRUNS, DALY E SNYDER, 1983). Greer e colaboradores (2000) mostraram que a teofilina pode ser utilizada como um ergogênico durante um esforço físico.

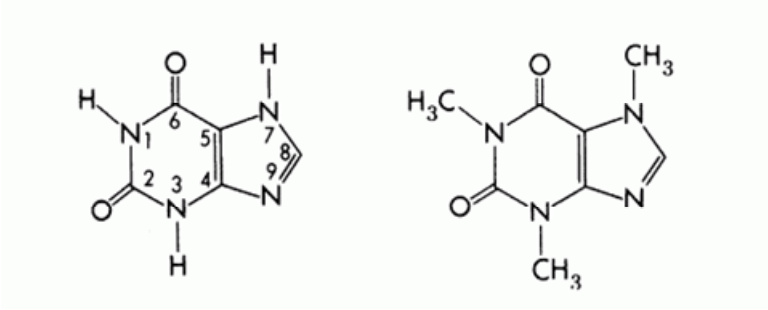



Figura 3– fórmula química da xantina e cafeína.

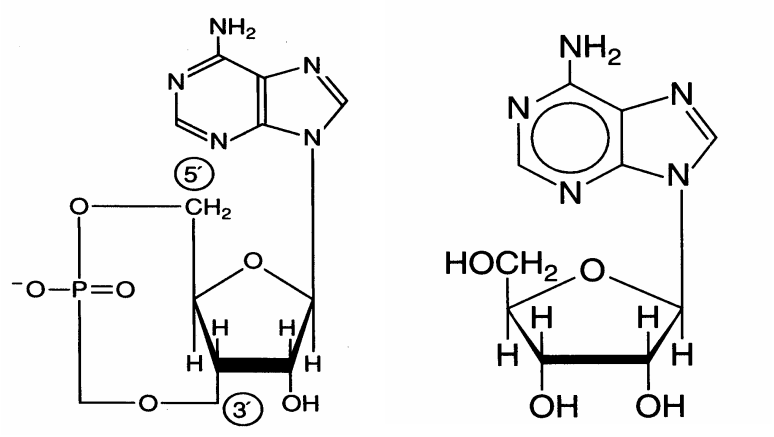


Figura 4- cAMP e adenosina.

A adenina pode ser desaminada no corpo para hipoxantina; oxidada para xantina e oxidada novamente para ácido úrico (fig 5).

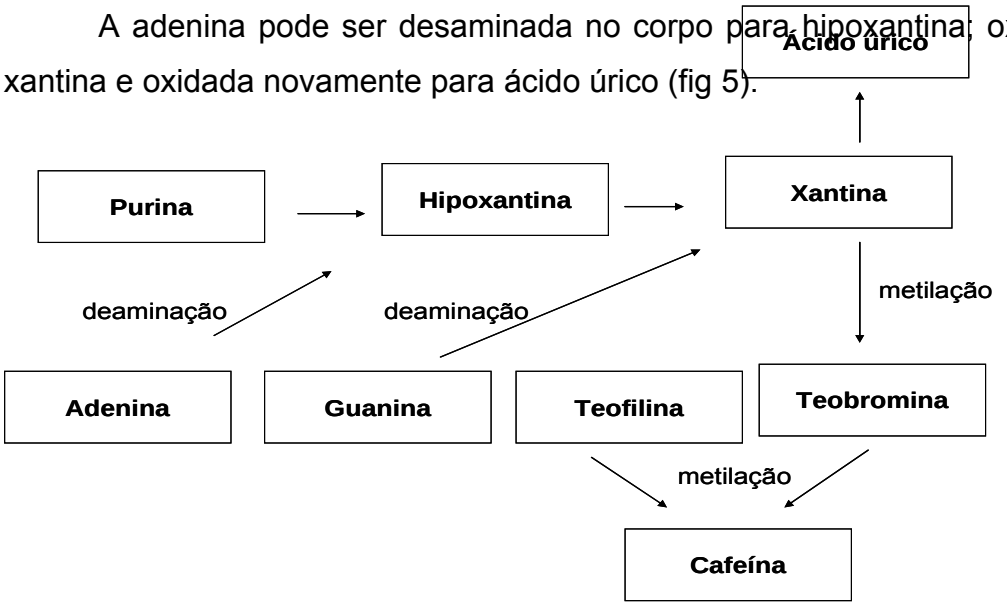



Figura 5 – desaminação e metilação das purinas.

**Como a cafeína atua no organismo para melhorar o desempenho físico?**

A cafeína é uma substância ergogênica popular entre os atletas, e a sua ingestão como suplemento é realizada com o propósito de aumentar a "performance" física. Uma das hipóteses para esse aumento na performance, causada pela ingestão de cafeína, é que ela atua na mobilização de ácidos graxos livres, e economiza assim, o glicogênio usado por músculos ativos.

1) Economia do glicogênio – efeito ergogênico

Já na década de 70 especulava-se o efeito ergogênico da cafeína. Os pesquisadores propunham que a ingestão de cafeína antes de um exercício físico promovia um aumento na concentração de ácidos graxos livres (FFA), em conseqüência de um aumento do metabolismo das gorduras e da inibição do

metabolismo dos carboidratos. Assim, o glicogênio muscular seria poupado e o desempenho físico favorecido (ESSIG E COSTILL, 1980). Entretanto, a hipótese de que o efeito ergogênico da cafeína é próprio da mobilização de ácidos graxos livres não tem encontrado suporte na literatura recente (JACKMAN et al.,1996; GREER, FRIARS E GRAHAM, 2000).

A cafeína pode ter um efeito indireto no metabolismo por alterar a atividade neuroendócrina ou a atividade nervosa simpática (DAVIS et al., 2003). Laurent e cols (2000) relataram que a ingestão de cafeína 90 minutos antes do exercício aumentava a concentração plasmática de epinefrina, cortisol e β-endorfinas, as quais estariam contribuindo com os efeitos benéficos da cafeína durante o exercício de endurance. O aumento dessas substâncias pode diminuir a percepção de dor e promover euforia, o que estaria atuando na melhora do desempenho durante o exercício de endurance (HARBER E SUTTON, 1984).

2) Similaridade com a Adenosina

A similaridade na estrutura química entre a porção adenina, da molécula de adenosina e, a molécula de cafeína é o ponto chave para se compreender uma das atuações mais discutidas da cafeína nos últimos tempos. Devido a essa semelhança a cafeína pode ocupar o lugar da adenosina em algumas funções metabólicas, como por exemplo se ligar aos receptores de adenosina e inibir a fosfodiesterase.

2.1) Fosfodiesterase e receptores de adenosina

A fosfodiesterase é a enzima responsável pela quebra do 3’5’-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). O nível celular dessa molécula depende da atividade da adenilato ciclase e da fosfodiesterase. As xantinas inibem a fosfodiesterase e a quebra do cAMP.

O cAMP é a molécula mensageira secundária de vários hormônios, como a acetilcolina, catecolaminas, glucagon, tiroxina e insulina. Aumentos nos níveis de

cAMP podem afetar o metabolismo de diferentes maneiras (NIKOLIC, BJELAKOVIC, STOJANOVIC, 2003).

Quando a cafeína se liga ao receptor da fosfodiesterase inibe a ação dessa enzima, e previne assim, a hidrólise do cAMP. Essa ligação se torna possível devido à similaridade estrutural entre a cafeína e a adenina. Os níveis de cAMP aumentam após tratamento com cafeína (NAHORSKI E ROGERS, 1976).

A adenosina é um constituinte celular normal, originada da degradação do ATP e de outros nucleotídeos de adenosina (LATINI E PEDATA, 2001). Durante a contração muscular as concentrações de adenosina aumentam no músculo e no plasma. No cérebro ela aumenta quando a pessoa está acordada e diminui durante o sono (HUSTON el al., 1996; PORKKA-HEISKANEN, 1999).

Os receptores de adenosina são encontrados em muitos tecidos, como cérebro, coração, músculo liso, adipócitos e músculo esquelético, embora a natureza desses receptores no músculo esquelético ainda seja pouco entendida. A molécula de cafeína é similar o bastante a de adenina para se ligar aos receptores de adenosina, mas não é similar o bastante para estimulá-los, sendo que a ubiqüidade e a variedade nos tipos desses receptores facilitam a molécula de cafeína afetar simultaneamente uma variedade de tecidos (GRAHAM, 2001). Então, uma das principais ações da cafeína seria bloquear os receptores de adenosina.

A administração intracerebroventricular (SNC) do agonista da adenosina 5'-N-etilcarboxaidoadenosina (NECA) reduziu significativamente o tempo para a fadiga, enquanto a cafeína aumentou o tempo de corrida para a fadiga. Os efeitos inibitórios da NECA eram reversíveis quando havia um pré-tratamento com a cafeína, sugerindo que os efeitos ergogênicos da cafeína no SNC são mediados através do bloqueio dos receptores seletivos de adenosina (DAVIS et al., 2003).

**Doses ótimas:**

Bell e Mclellan (2002) demonstraram em seus estudos que a dose de 5mg/kg de cafeína seria uma dose ótima para não consumidores de cafeína, porém não seria para consumidores. Graham e Spriet (1995) reportaram que em um teste onde a dose de 9mg/kg era administrada, os sujeitos que tinham um consumo mais leve de cafeína tendiam a ter suas respostas mais pobres após esta alta dose de cafeína.

Os estudos de Davis e colaboradores (2003) mostraram que a administração de cafeína no SNC, em uma dose de 200µg/rato (~0.6mg/kg), aumentava o tempo de corrida na esteira para a fadiga em 60% em ratos. Esta dose é muito menor do que a dose dada perifericamente (6mg/kg). A mesma dose de cafeína dada perifericamente (intraperitonealmente) é inefetiva.

Os benefícios ergogênicos da cafeína podem ser influenciados pela dose, intensidade, tipo de exercício, uso prévio de cafeína, status de treinamento e variação da resposta individual a suplementação. O pico plasmático da concentração da cafeína é de aproximadamente 1 hora (Graham, 2001). A maior parte dos estudos utilizam a dose de 5 mg/kg ou 6 mg/kg.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA


1. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; BOBERTS, K.; WATSON, J.D (1994). *Molecular Biology of The Cell*, 3rd ed.

2. ARAKAWA, K (1993). Antihypertensive mechanism of exercise. *J. Hipertens*; 11: 223-229.

3. BELL, D.G; McLELAN, T.M (2002). Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J. Appl. Physiol*, 93(4): 1227-1234.

4. BODIS, S.; HAREGEWOIN, A.(1993); Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva. *Biochemical and Biopysical research communications*. 194:347-350. July 15.

5. BORTOLINI, M. A. Biomarcadores Salivare do Exercício Físico para Determinação do Limiar Anaeróbico Humano. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica ) – Universidade Federal de Uberlândia, 2003. 130p.

6. BRADFORD, M. M (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Biding. *Protein Assay By Dye Biding* p. 248-254.

7. BRUNS, R; DALY, J; SNYDER, S (1983). Adenosine receptor binding: structure activity analysis generates extremely potent xanthine antagonist. *Proc Natl Sci USA*, 80: 2077-2080.

8. CALVO, F.; CHICHARRO, J. L.; BANDRÉS, F.; LUCIA, A.; PERES, M.; ÁLVARES, J.; MOJARES, L. L.; VAQUERO, A. F.; LEGIDO, J. C. (1997)

Anaerobic threshold determination with analysisof salivary amylase. *Can. J. Appl. Physis* , 6(22): 553-561.

9. CHICHARRO, J. L.; PEREZ, M.; VAGUERO, A. F.; URENA, R. (1998); Saliva Composition and Exercise. *Sports Med,* 26(1): 17-27.

10. CHICHARRO, J. L.; LEGIDO, J. C.; ALVARES, J.; SERRATOSA, L.; BANDRES, F.; GAMELLA, C (1994). Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic theshold determination. *Kur- J. Appl Phys*, 68:. 214-218.

11. CAI, H; GRIENDLING, KK; HARRISON, DG (2003). The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Pharmacological Sciences*. 24(9): 471-478.

12. CHICARRO, J.L; ARCE, J.C.L (1991). *Umbral anaerobio bases fisiologicas y aplicacion*. Madrid, interamericana.

13. CHIRPAZ-ODDOU, M. F.; FAVRE-JUVIN, A.; FLORE, P.; ETERRADOSSI, J.; DELAIRE, M.; GRIMBERT, F.; THERMINARIAS, A (1997). Nitric oxide response in exhaled air during an incremental exhaustive exercise. *J. Appl. Physio*, 82(4): 1311-1318.

14. CHUMURA, J.;NAZAR, K.; KACIUBA-USCILKO, H (1994). Choice reaction time during graded exercise in relation to blood lactate and plasma catecholamine thresholds. *International journal of sports medicine*, 15: 172-178.

15. CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B (1995). Nitric Oxide: Biochemistry, Physiology and Phatophysiology. *Methods: Comp. Meth. Enzim*. 7: 3-13.

16. DAVIS, J.M; ZHAO, Z; STOCK, H.S; MEHL, K.A; BUGGY, J; HAND, G.A (2003). Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Reul Integr Comp Physiol,* 284: 399-404.

17. DAVIS, M.E; CAI, H; MC CANN, L; FUKAI, T; HARRISON, DG (2003). Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284: 1449 – 1453.

18. DAVIS, M.E; CAI, H; DRUMMOND, G.R; HARRISON, D.G (2001). Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-src by divergent signaling pathways. *Circ.Res*, 89: 1073-1080.

19. DAWES, C (1974). Rhytms in salivary flow rate and composition. *Int J Chronobiol* , 2:253-79.

20. DENNISS, A. R.; YOUNG, J. A (1978). Modufication of salivary duct eletrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin. VIP, GIP, and other enterohormones. *Pfugers Arch*, 376: 73-80.

21. ESSIG, D.L., COSTILL, D.L., VAN HANDEL, P.J (1980). Effects of caffeine ingestion on utilization of muscle glycogen and lipid during leg ergometer cycling. *Int. J. Sports Med.*1: 86-90.

22. FUKAI, T.; SIEGFRIED, M. R.; USHIO-FUKAI, M.; CHENG, Y.; KOJDA, G. AND HARRISON, D. G (2000). Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *The journal of Clinical Investigation,* 105:1631-1639.

23. FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B (2000). Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Ass Méd Brasil*,. 46(3): 265-271.

24. FURCHOGOTT, R. F.; CHERRY, P. D.; ZAWAKZKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D (1984). Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J cardiovasc Pharm,* 53: 557-573.

25. GELLER, D.A., NUSSLER, A.K., DISILVIO, M., LOWENSTEIN, C.J., SHAPIRO, R.A., WANG, S.C., SIMMONS, R.L., BILLIAR, T.R. (1993). Citokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of

inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 90: 522-526.

26. GOTO, C., HIGASHIM,Y., KIMURA, N., BINA, K., HARA, K., NAKAGAWA, K., KAWAMURA, M., CHAYAMA, K., YOSHIZAMI, M., NARA, I (2003). The effect of different intensities of exercise on endothelium- dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation*, 108: 530-535.

27. GRAHAM, D.A., RUSH, J.W (2004). Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol*, 96:2088-2096.

28. GRAHAM, T.E., HIBBERT, E., SATHASIVAM, P (1998). Metabolic and exercise endurance effects of coffee and caffeine ingestion. *J. Appl. Physiol*. 85(3): 883-889.

29. GRAHAM, T. E (2001). Caffeine and exercise. Metabolism, endurance and performance. *Sports med*, 31(11): 785-807.

30. GRAHAM, T.E., SPRIET. LL (1995). Performance and metabolic response to a high caffeine dose during prolonged exercise. *J Appl Physiol,* 71: 2292-2298.

31. GREER, F.; FRIARS, D.; GRAHAM, T. E (2000). Comparison of caffeine and theophylline ingestion: exercise metabolism and endurance. *J Appl Physiol*, 89: 1837-1844.

32. GRIENDLING, KK.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M (2000). NADPH oxidases: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86:494-501.

33. HARBER, V.J; SUTTON, J.R (1984). Endorphins and exercise. *Sports Med*. 1:154-171.

34. HIGASHI, Y., SASAKI, S., SASKI, N., NAKAGAWA, K., UEDA, T., YOSHIMIZU, A., KURISU, S., MATSUURA, H., KAJIYAMA, G., OSHIMA, T. (1999). Daily aerobic exercise improves reactive hyperemia in patients with essential hypertension. *Hipertension,* 33: 591-597.

35. HOLLMANN, W (1985). Historial remarks on the development of the aerobic-anaerobic threshold up to 1966. *International Journal of Sports Medicine,* 6: 109-116.

36. HORNIG, B. H.; MAIER, V.; DREXLER, H (1996). Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation,* 32: 210-214.

37. HUSAIN, K (2003).Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressure, heart rate, NO and atioxidants in plasma of rats. *Pathophysiology,* 10: 47-56.

38. HUSTON, J.P; HAAS, H.L; BOIX, F; PFISTER, M; DECKING, U; SCHERADER, J; SCHWARTING, R.K.W (1996). Extracelular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats*. Neuroscience*, 73: 99-107.

39. IWAMOTO, J.; PENDERGAST, D. R.; SUZUKI, H.; KRASNEY, J. A (1994). Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans. *Respir. Physiol,* 97 (3): 334-345.

40. JENSEN, J.L.; KARATSAIDIS, A.; BRODIN, P (1998). Salivary secretion: stimulatory effects of chewing-gum versus paraffin tablets. *European Journal of oral sciences*, 103: 892-896.

41. JOINT NATIONAL COMMITTEE ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE (1997). The sixth report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC-VI). *Arch Intern Med*, 157: 2413-2446.

42. JUEL, C (1996). Muscle pH regulation: role of training. *Acta Physiologica Scandivavica*, 162: 359-366.

43. KINGWEEEL, B.A (2000). Nitric Oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of trainig in heath and cardiovascular disease. *The FASEB J. Melboume,* 14: 1685-96.

44. LATINI, S; PEDATA, F (2001). Adenosine in the central nervous system: realese mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem*, 79: 463-484.

45. LAURENT, D.; SCHNEIDER, K.E.; PRUSACZYK, W.K.; FRANKLIN, C.; VOGEL, S.M.; KRSSAK, M.; PETERSEN, K.F.; GOFORTH, H.W.; SHULMAN, G.I. Effects of caffeine on muscle glycogen utilization and the neuroendocrine axis during exercise. *The journal of clinical endocrinology e metabolism,* 85(6): 2170-2175.

46. LENANDER-LUMIKARI, M., IHALIN R., LAÈHTEENOJA H (2000). Changes in whole saliva in patients with coeliac disease. *Psychoneuroendocrinology,* 26: 165–173.

*47.* LUSCHER, TF (1994). Local relaxant and constricting factors in the vessel wall. In: *Textbook of hypertension, edited by Swales JD. Oxford: Blackwell Scientific,* 145 – 159.

48. MAEDA, S; MIYAUCHI, T; KAKIYAMA, T; SUGAWARA, J; IEMITSU, M; IRUKAYAMA-TOMOBE, Y; MURAKAMI, H; KUMAGAI, Y; KUNO, S; MATSUDA, M (2001). effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelium-1 and nitric oxide, in healthy young humans. *Life Sci*, 69: 1005 – 1016.

49. MAROUN, M. J.; MEHTA, S.; TURCOTTE, R.; COSIO, M. G.; HUSSAIN, S. N (1995). Effect of phsical conditioning on endogenous nitric oxide output during exercise. *J Appl. Physiol,* 79(4): 1219-1225.

50. MATSUMOTO, A.; HIRATA, Y.; MOMOMURA, S., et al (1994). Increased nitric oxide production during exercise. *Lancet,* 343: 849-850.

51. MIYACHI, T., MAEDA, S., IEMITSU, M., KOBAYASHI, T., KUMAGAI, Y., YAMAGUSHI, I., MATSUDA, M (2002). Exercise causes a tissue-specific change of NO production in the kidney and lung. *J Appl Physiol,* 94: 60-68.

52. MOTL, T.W.; 'O CONNOR, P.J.; DISHMAN, R.K (2003). Effect of caffeine on perceptions of leg muscle pain during moderate intensity cycling exercise. *The journal of Pain*, 4(6): 316-321.

53. MULLER, J.M; CHILLIAN, W.M; DAVIS, M.J (1997). Integrin sinaling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronay arterioles.*Cir.Res,* 80: 320-326.

54. NAHORSKI, S.R; ROGERS, K.J (1976). Inhibition of 3'5'-nucleotide phosphodiesterse and stimulation of cerebral cyclic AMP formation by biogenic amines in vitro an in vivo. *Neuropharmacology,* 15: 609-612.

55. NAVAZESH, M (1993). Methods for collecting saliva. Annals of the New York Academy of Science, Saliva as a diagnostic fluid, 694: 72-77.

56. NIKOLIC, J., BJELAKOVIC, G., STOJANOVIC, I (2003). Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Molecular and cellular Biochemistry*, 244: 125-128.

57. NUSSLER, A.K., KELLER, D.A., SWEETLAND, M. A., DISILVIO, M., BILLIAR, T.R., MADARIAGA, J.B SIMMONS, R.L., AND LANCASTER, J.B., JR (1993). Induction of nitric oxide synthesis and its reaction in cultured human and rat hepatocytes stimulated with cytokines plus LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 194: 826-835.

58. OLIVEIRA, F. R.; GAGLIARD, J. F. L.; KISS, M. A. P. D (1994). Proposta de referência para prescrição de treinamento aeróbico e anaeróbico para corredores de média e longa duração. *Revista Paulista de Educação Física,* 8( 2): 68-76.

59. PANOSSIAN, A. G.; OGANESSIAN, A. S.; AMBARTSUMIAN, M.; GABRIELIAN, E. S.; WAGNER, H.; WILMAN, G (1999). Effects of heavy physical exercise an adaptogens on nitric oxide content in human saliva. *Phytomedicine*, 6 (1): 17-26.

60. PERSSON, M. G.; WIKLUND, N. P.; GUSTAFSSON, L. E (1993). Endogenous nitric oxide in single exhalations and the chazige during exercise. *Am. Rew. Respir. Dis*, 148(5): 1210-1214.

61. PRAKOBPHOL, A.; XU FHOANG, V. M.; LARSSON, T.; BERGSTROM, J.; JOHANSSON, I.; FRANGSMYR, L.; HOLMSKOV, U.; LEFFLER, H.; NILSSON, C.; BORE, T.; WRIGHT, JR.; STROMBERG, N.; FISHER, S.J (2000). Salivary Agglutinin, Which Binds Streptococcus mutans and Helicobacter pylori, Is the Lung Scavenger Receptor Cysteine-rich Protein gp-340. *J.Biol. Chem,* 275: 39860–39866.

62. PORKKA-HEISKANEN, T (1999). Adenosine in sleep an wakefulness. *Ann Med*, 31: 125-129.

63. PORT, K (1991). Serum and saliva cortiso responses and blood lactate accumulation during incremental exercise testing. *Int J Sports Med*, 12: 490-494.

64. ROBERGS, R. A (2001). Exercise-Induced Metabolic Acidosis: Where do the Protons come from? *Sportscience, Alburqueque*, 5(2): 1-20.

65. RUSH, J.W.E; TURK, J.R; LAUGHLIN, M.H (2003). Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284: 1378 – 1387.

66. SAHLIN, K.; KATZ, A.; HENRIKSSON, J (1987). Redox state and lactate accumulation in humam skeletal muscle during dynamic exercise. *Biochemical Journal,* 245: 551-556.

67. SCHNABEL, A.; KINDERMANN, W.; SCHMITT, W. M.; BIRO, G.; STEGMANN, H (1982). Hormonal and metabolic consequences of prolonged running at the individual anaerobic threshold. *International Journal of Sports Medicine*, 3: 163-168.

68. SCHNEYER, L.H (1976). Sympathetic control of Na, K transport in perfused submaxillary main duct of rat. *Am J. Phsiol*, 230: 341-345.

69. SCHNEYER, LH.; YOUNG, JA., SCHENEYER, CA. (1972), salivary secretion of electrolytes. *Physiol Rev,* 52: 720-77.

70. SCHUETZ, W.; TRAEGER, K.; ANHAEUPL, T.; SCHANDA, S.; RAGER, C.; VOGT, J.; GEORGIEFF, M (1995). Adjustment of metabolism, catecholamines and beta-adrenoceptors to 90 min of ccle ergometry. *European Journal of Applied Physiology,* 70: 81-87.

71. SESSA, WC; PRITCHARD, K; SEYEDI, N; WANG, J; HINTZE, TH (1994). Chronic exercise in dogs increase coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res*, 74: 349 – 353.

72. SHIRTCLIFF, E.A.; GRANGER, D.A.; SCHWARTZ, E.; CURRAN, M.J (2001). Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psyconeuroendocrinology*, 26: 165-173.

73. SIGEL, A.; SIGEL, H (1999). *Metal ions in biological system,* 36.

74. SIMÕES, H.G.,CAMPBELL, C.S.G.,BALDISSERA, V., DENADAI, B.S., KOKUBUN, E (1998). Determinação do limiar anaeróbico por meio de dosagens glicêmicas e lactacidêmicas em testes de pista para corredores. *Revista paulista de educação física,* 12 (1): 17-30.

75. SNYDER, S. H.; BREDT, D. S (1992). Biological role of nitric oxide. *Science Am,* 266: 68-77.

76. STEGMANN, H.; KINDERMANN, W.; SCHNABEL, A (1981). Lactate Kinetics and individual anaerobic threshold. *International Journal of Sports Medicine*, 2: 160-165.

77. SCHWARTZ, M.A; LECHENE, C (1992). Adhesion is required for protein kinase C-dependent activation of the $Na^+$ /$H^+$ antiporter by platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA,* 89: 6138-6141.

78. TAKAI, N.; UCHIHASHI, K.; HIGUCHI, K.; YOSHIDA, Y.; YAMAGUCHI, M (1999). Localization of neuronal-constitutive nitric oxide synthase and secretory regulation by nitric oxide in the rat submandibular and sublingual glands. *Archives of Oral Biology*, 44: 745-750.

79. TAKESHITA, S; INOUE, N; UEYAMA, T; KAWASHIMA, S; YOKOYAMA, M (2000). Shear stress enhances glutathione peroxidase expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commum*, 273: 66-71.

80. TRAUB, O; BERK, B.C (1998). Laminar shear stress: mechanism by which endothelial cells transducer an atherprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 677-685.

81. TEGTUBER, U; BUSSE, M.W; BRAUMANN, K.M (1993). Estimation of an individual equilibrium point between lactate production and remotion during exercise. *Med. Sci. sports and exercise,* 25: 620-627.

82. TSENG, H; PETERSON, T.E; BERK, B.C (1995). Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ. Res*, 77: 869-878.

83. UCKO, D.A (1992). Química para ciências da saúde. *Editora manole*, 2º edição. São Paulo.

84. YOUNG, J. A, VAN LENNEP, E. W (1979). Transport in salivary glands. Giesbisch G. Tosteson DC, Ussing HH, Membrane tranport in biology, Bertin, p. 563-674.

85. WALSH, N. P.; BLANNIN, A. K.; CLARK, A. M.; COOK, L.; ROBSON. P. J.; GLEESON. M (1999). The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. *J Sports Sci,* 17 (2): 129-134.

86. WASSERMAN, K.; HANSEN, J. E.; SUE, D. Y.; WHIPP, B. J (1986). Principles of exercise testing and interpretation. *Lea & Febiger, Philadelphia*.

87. WOODMAN, C.R; MULLER, J.M; LAUGHLIN, M.H; PRICE, E.M (1997). Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise- trained pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 273: 2575 – 2579.

# CAPÍTULO ÚNICO

## EFEITOS DA INGESTÃO DE CAFEÍNA NA TAXA DE BIOMARCADORES SALIVARES, NO LACTATO PLASMÁTICO E NO DESEMPENHO FÍSICO.

## RESUMO

Este estudo investigou o efeito da ingestão de cafeína na taxa de biomarcadores salivares, no lactato plasmático e na performance física, durante teste incremental no cicloergômetro. Testamos 16 ciclistas e praticantes de spinning em um teste adaptativo*, fase A*, e após a ingestão de placebo e cafeína (5mg/kg), *fase B*. O protocolo de exercício iniciava-se com uma carga de 50W, com incrementos de 25W a cada dois minutos, até exaustão voluntária. Amostras de sangue e saliva eram coletadas no repouso e durante o segundo minuto de cada taxa incremental. Essas amostras eram processadas e armazenadas a -20°C. Os resultados deste estudo mostraram que houve variações inter-individuais na concentração de proteínas totais, na *fase A*. Na *fase B* a ingestão de cafeína, uma hora antes do teste, aumentou a concentração média de proteínas totais ($p<0.05$) e os níveis de óxido nítrico ($p<0.01$). Os limiares de lactato sanguíneo e proteínas totais foram altamente correlacionados, nas duas fases do teste, entretanto na *fase B* após a suplementação de cafeína a correlação caiu devido ao aumento de proteínas salivares e ao não aumento de lactato sanguíneo. A cafeína melhorou a performance aumentando o tempo de exercício dos indivíduos suplementados. Entretanto, dois voluntários apresentaram indisposição no pós-exercício, sugerindo cuidados individuais ao se consumir cafeína. Então, concluímos que a cafeína alterou a concentração de NO

e proteínas, não influenciou na concentração de lactato sanguíneo, e atuou no sentido de melhorar o desempenho físico.

Palavras-chaves: exercício, cafeína, ergogênico, oxido nítrico, saliva, limiares anaeróbicos,

## ABSTRACT

.This study investigated the effect of the caffeine ingestion in the salivary biomarkers, blood lactate and the physical performance, during incremental test in cycle ergometer. We tested 16 cycle men and practitioners of spinning in an adaptative test, *phase A*, and after the ingestion of placebo and caffeine (5mg/kg), *phase B*. The exercise protocol was initiated with a load of 50W, with increments of 25W to each two minutes until voluntary exhaustion. Saliva and blood samples were collected at rest and during the second minute of each work rate increment. These samples were processed and stored -20°C. The results of this study had shown that in the Inter-individual variations in the total protein concentration, in the *phase A*. In *phase B* the caffeine ingestion, one hour before the test, increased the mean total protein concentration ($p<0.05$) and the nitric oxide levels ($p<0.01$). The thresholds of blood lactate and total proteins highly had been correlated, in the two phases of the test, however in phase B, after the caffeine ingestion, the correlation falled, due to the increase salivary protein and not the blood lactate increase. The caffeine improved the performance increasing the time of exercise of the supplemented individuals. However, two subjects had presented indisposition in the post-exercise, suggesting well-taken care of individual to if consuming caffeine. Then, we conclude that the caffeine modified the concentration of nitric oxide and proteins, did not influence in the blood lactate concentration, and improved the physical performance.

Key-words: exercise, caffeine, ergogenic, nitric oxide, saliva, thresholds

# INTRODUÇÃO

A ingestão de cafeína é associada com a melhora no desempenho físico. Alguns estudos verificaram a influência que a cafeína exerce na economia do glicogênio (ESSIG, COSTILL E VAN HANDEL, 1980), na liberação de adrenalina (JACKAMAN et al., 1996) na inibição dos receptores de adenosina (DAVIS et al., 2003) e na melhora do tempo de exercício (CONWAY, ORR E STANNARD, 2003).

Para avaliar o efeito da cafeína no esforço físico, estudos analisam a atividade elétrica muscular (KALMAR E CAFFARELLI, 1999; PLASKETT E CAFARELLI, 2001), a presença de paraxantina e cafeína no sangue e na urina (CONWAY et al, 2003), a análise de biomarcadores sanguíneos do exercício como glicsose e glicerol (MOUGLOS et al, 2003), catecolaminas (GREER, MCLEAN E GRAHAM, 1998), dentre outros. Uma alternativa às análise convencionais para monitorar o exercício físico e o efeito do ingestão de cafeína seria a determinação na saliva de biomarcadores do exercício. A utilização da saliva apresenta algumas vantagens como coleta fácil, não invasiva (O'CONNOR E CORRIGAN, 1987) e nível de biosegurança classe I (GUILBAULT E PALLESCHI, 1995).

Alguns estudos mostraram que durante e após esforço físico havia alterações na taxa de fluxo salivar (WALSH et al, 1999 BISHOP et al., 2000; WALSH et al, 2004), e em alguns biomarcadores como óxido nítrico (NO) (PANOSSIAN et al.,1999), IgA e proteínas (WALSH et al, 1999). Outros estudos buscam monitorar o exercício físico a partir de correlações entre biomarcadores salivares e lactato sanguíneo. Pontos de inflexões nas concentrações de eletrólitos (CHICHARRO et al 1994), amilase (CALVO et al., 1997), cortisol (PORT, 1991) e proteínas totais (PAT) (BORTOLINI et al., 2005), são altamente correlacionados com o limiar anaeróbico de lactato sanguíneo (AT).

O óxido nítrico é um gás produzido pela oxidação da L-arginina a citrulina, por diferentes isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), as quais podem ser

constitutivas, como a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), ou induzível (iNOS) (NATHAN E QXIE, 1994). Fatores mecânicos, como o atrito de cisalhamento (*shear stress*), e químicos como a bradicinina e acetilcolina, são estímulos para a sua liberação (FURCHGOTT E ZAWDZKI, 1980), a partir do aumento do influxo de cálcio para o interior das células endoteliais (SIGEL E SIGEL, 1999). Aumentos no fluxo sanguíneo são relatados após a infusão de acetilcolina, em resposta ao exercício intenso (HAMBRECHT et al, 1998), moderato (GOTO et al., 2003) e em ratos hipertensivos (GRAHM E RUSH 2004). O treinamento crônico aumenta os níveis de nitrito e nitrato, produtos de oxidação do NO, e a vasodilatação dependente do endotélio (MAEDA et al, 2001). A presença de NO pode ser quantificada na saliva pela dosagem dos ânions nitrito ou nitrato resultantes da estimulação das glândulas salivares com suco de limão (BODIS E HARGEWOIN, 1993). Dados de monitoramento de NO na saliva durante o exercício físico revelaram que os níveis de NO elevam-se após exercício físico alta intensidade em atletas inciantes (PANOSSIAN et al., 1999).

A cafeína é conhecida por estimular o sistema nervoso central aumentando a secreção de epinefrina (JACKMAN et al.,1996; GRAHAM, HIBBERT e SATHASIVAN, 1998; LAURENT et al., 2000), o que poderia produzir um número de mudanças metabólicas secundárias. Laurent et al (2000) relataram que a ingestão de cafeína 90 minutos antes do exercício aumentava a concentração plasmática de epinefrina, cortisol e β-endorfinas, as quais estariam contribuindo com os efeitos benéficos da cafeína durante o exercício de endurance. O aumento dessas substâncias pode diminuir a percepção de dor e promover euforia, o que atuaria na melhora do desempenho durante o exercício de endurance (HARBER E SUTTON, 1984; MOTL, O'CONNOR e DISHMAN, 2003). Estudos têm mostrado que aumentos na atividade adrenégica podem ser detectados na saliva a partir de aumentos na alfa amilase e cortisol (NATER et al,2005).

O propósito deste estudo é investigar o potencial ergogênico da cafeína no exercício, examinando após sua ingestão, as alterações de biomarcadores, tais

como lactato plasmático e proteínas totais e óxido nítrico da saliva. Além disso, determinar a correlação dos limiares anaeróbicos de lactato plasmático e, proteínas totais da saliva. Desse modo, considera-se a hipótese de que a cafeína administrada uma hora antes da atividade física no cicloergômetro até exaustão poderá melhorar o desempenho físico e alterar a liberação de possíveis biomarcadores do exercício em função das respostas metabólicas secundárias geradas pela sua ingestão.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Voluntários:** Dezesseis voluntários do sexo masculino, não fumantes, ciclistas ou praticantes de *spinning,* com idade variando de 19 a 35 anos participaram deste estudo. A todos foi dado um termo de consentimento conforme determina o conselho nacional de saúde do Brasil, resolução 196/96. O projeto foi devidamente aprovado pelo comitê de ética local da Universidade Federal de Uberlândia.

**Procedimentos**: Os voluntários compareceram ao laboratório em três ocasiões. A primeira visita era informal onde se explicava o procedimento do teste e orientava-se quanto aos cuidados a serem tomados. Na segunda e na terceira visita os voluntários executavam dois testes incrementais no cicloergômetro (ERGO-FIT 167, Pirmasens, Germany) a mesma hora do dia, 14h30min a -17h30min após o descanso. Os voluntários abstinham-se de comidas e bebidas que continham cafeína por 24 horas antes do teste, e eram instruídos também para não realizarem seu treinamentos normais.

**Protocolo experimental**: o protocolo experimental era dividido em duas fases, *A e B,* onde os voluntários compareciam ao laboratório duas vezes em estado pós-prandial. Em cada fase realizava-se um teste, sendo que cada teste era separado pelo intervalo de uma semana. Para um dado sujeito todos os experimentos eram conduzidos ao mesmo tempo do dia. Os voluntários

abstinham-se de seus treinamentos normais e de bebidas que contivessem cafeína ou qualquer substância estimulante.

Na fase A os 16 voluntários eram previamente avaliados e faziam um teste adaptativo incremental no cicloergômetro. Eles eram previamente hidratados, ingerindo aproximadamente 400mL de água nos 30 minutos anteriores ao teste. O teste era realizado com incremento de carga, com a freqüência de pedalada se situando estritamente entre 68 e 72 rpm. Se o voluntário não mantivesse essa rotação de pedalada detectava-se a exaustão voluntária. Fazia-se um aquecimento prévio de 2 minutos a 50 watts, e o teste iniciava-se com a mesma carga. Esta carga era aumentada em 25W a cada 2minutos. Uma amostra de sangue e de saliva era coletada no repouso e durante o segundo minuto de cada taxa de trabalho incremental. A freqüência cardíaca foi mensurada com um freqüencímetro polar cardíaco (Polar Sport Tester).

Na fase B os procedimentos do teste eram os mesmos, entretanto os voluntários ingeriam cafeína (5mg/kg) ou amido 1 hora antes do mesmo. Nessa fase 9 dos 16 voluntários foram suplementados com cafeína e 7 com amido. Essa suplementação era realizada em cápsulas de gelatina e de uma maneira duplo-cega randomizada. Este tempo foi escolhido porque de acordo com dados da literatura, a cafeína é rapidamente absorvida pelo organismo e sua concentração plasmática aproxima-se de um nível máximo 1 hora após sua ingestão (GRAHAM, 2001). Após o término da segunda fase os grupos foram divididos em grupo cafeína e placebo para que fossem analisados. Essa classificação foi utilizada também no teste adaptativo *(fase A)*, somente para nomear os grupos. Entretanto, nessa fase não houve suplementação. Ela foi realizada para que pudéssemos obter uma avaliação prévia dos voluntários.

**Estimulação salivar e procedimentos inic**iais: para se obter um fluxo salivar satisfatório foi feita uma estimulação prévia das glândulas salivares com goma de mascar (Trident®-menta), e a partir disso a saliva era coletada em provetas graduadas de acordo com Navazesh (1993). As amostras de saliva eram obtidas no repouso, durante o segundo minuto de cada taxa incremental. Os

voluntários enxaguavam a boca repetitivamente com água deionizada e posteriormente a saliva era coletada para a obtenção do fluxo salivar pré-exercício. Este procedimento era realizado nos últimos 5 minutos antecedentes ao teste. A saliva coletada nos primeiros 2 minutos era descartada e a dos 3 minutos ulteriores coletada em uma proveta graduada.

**Coleta da saliva em cada estágio**: dado o início do teste, o voluntário era informado 30 segundos antes de cada mudança de estágio para que deglutisse a saliva e, começasse então, a mascar o chiclete; a coleta se processava ao término de cada taxa incremental. As amostras eram mantidas a 4°C e levadas para o laboratório em no máximo 3 horas. Uma vez no laboratório as amostras eram centrifugadas 14000 x g e o sobrenadante separado e estocado a -20°C para análise.

**Coleta de sangue**: a coleta de sangue (25μL) foi feita a partir do lóbulo da orelha com capilares de vidro heparinizados e devidamente calibrados. Posteriormente, o sangue era transferido para micro-tubos contendo 50μL de fluoreto de sódio 1%. Os tubos eram armazenados no gelo por no máximo 3 horas. Após este período as amostras eram congeladas à -20°C até a análise.

Dosagens: a dosagem da concentração do óxido nítrico salivar foi feita a partir do método colorimétrico de Greiss, o qual mede a concentração de nitrito na saliva. Esse reagente é uma solução composta de N-(1-Naphthyl) ethyl-ene Diamine. (NEED) (sigma) a 0,1%, e sulfanilamida (sigma) a 1%, preparados com ácido fosfórico a 2,5% . A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro (Titertek multiskan plus MK11) a uma leitura de 570nm e os dados foram analisados no software “Microplate”.

O lactato sangüíneo foi analisado pelo método eletro-enzimático (lactímetro USI 1500 Sport da Yellow Springs).

As proteínas totais da saliva foram mensuradas pelo método de Bradford (1976). Preparava-se uma curva padrão de Soro albumina bovina (BSA) e água desionizada. As amostras de saliva (30μL) eram distribuídas nos tubos correspondentes em duplicata. Logo após adicionava-se o reagente de Bradford

nos tubos a partir do controle, seguido pelas amostras. A leitura eram realizadas a 595nm no espectrofotômetro (Vis-UV Hitachi, modelo U-2000).

### Análise Estatística

Os dados no texto, tabelas e figuras estão representados pelos valores médios e erro padrão das médias (± EP). Utilizou-se o teste t-student para amostras independentes com o objetivo de identificar o comportamento dos voluntários, na *fase A* do estudo e subdividi-los em dois grupos: grupo cafeína e grupo placebo. O teste t-student para dados pareados foi utilizado para identificar o comportamento dos grupos entre o teste adaptativo (T1) e o teste após a suplementação com cafeína e amido (T2). A correlação de pearson foi utilizada para correlacionar os limiares anaeróbicos de lactato e proteínas totais. A significância estatística foi aceita com $p<0.05$.

## RESULTADOS

Os resultados mostram os valores médios da *fase A*, onde os voluntários realizaram um teste incremental no cicloergomêtro; e da *fase B* onde repetiram o mesmo teste suplementados com cafeína (5mg/Kg) e placebo.

### Frequência cardíaca

A freqüência cardíaca apresentou uma queda entre as duas fases do teste. A média da taxa de freqüência cardíaca na *fase A* do estudo foi similar entre os dois grupos (cafeína 120,8 bat/min ± 10,5; placebo 127,6 bat/min ± 12,6). Isto indica uma homogeneidade entre os indivíduos que pertenciam a esses grupos, sendo eles similares em seus condicionamentos. Na *fase B*, a média para os dois grupos apresentou uma queda significativa ($p<0.01$) (grupo cafeína 116,9 bat/min ± 10.4; placebo 122,8 bat/min ± 12,23).

**Proteínas totais repouso e exaustão**

A concentração de proteínas totais no repouso não apresentou alterações significativas após as duas suplementações. O grupo cafeína teve uma concentração média de 1,65 µg/µL (± 0,09) na fase A (1,65 µg/µL ± 0,09) e, 1,77 µg/µL (± 0,03) na fase B. O grupo placebo apresentou uma produção média de1,76 µg/µL (± 0,15) na fase A, e 1,94 µg/µL (± 0,13). Na exaustão a produção média de proteínas não sofreu alterações em nenhum dos dois tratamentos. A concentração média de proteínas na exaustão para o grupo cafeína na fase A era de 2,54 (± 0,15) e de 2,64 (± 0,15) após a suplementação na fase B. Para o grupo placebo a concentração média de proteínas na exaustão foi de 2,74 (±0,35) e na fase B 2,59 (± 0,27).

Na exaustão a produção média de proteínas não sofreu alterações em nenhum dos dois tratamentos. A concentração média de proteínas na exaustão para o grupo cafeína na fase A era de 2,54 (± 0,15) e de 2,64 (± 0,15) após a suplementação na fase B. Para o grupo placebo a concentração média de proteínas na exaustão foi de 2,74 (±0,35) e na fase B 2,59 (± 0,27).

**Proteínas totais durante o exercício, Lactato plasmático e Limiares anaeróbicos (AT e PAT)**

Os limiares anaeróbicos de lactato (AT) e proteínas (PAT) foram altamente correlacionados durante as duas fases do estudo (A e B) (figura 2). Entretanto, o tratamento com cafeína alterou a concentração de proteínas salivares e não influenciou na concentração de lactato plasmático. Na *fase A* do estudo a concentração média de proteínas totais era diferente entre os dois grupos que participaram do teste incremental no cicloergômetro (cafeína e placebo). Os voluntários que pertenciam ao grupo placebo apresentaram uma concentração média maior de proteínas totais na saliva (2,18 µg/µL ± 0,22) do que os que

pertenciam ao grupo cafeína (2,00 μg/μL ± 0,14) ($p<0.05$). Em contraste, na *fase B*, após a ingestão de cafeína esse grupo aumentou significativamente ($p<0.01$) a sua concentração de proteínas na saliva (2,18 μg/μL ± 0,13), sendo que o grupo placebo manteve a média próximo a da *fase A* (2,20 μg/μL ± 0,16). As concentrações de lactato sanguíneo não sofreram alterações entre a *fase A* e a *fase B* do estudo. Na *fase A,* a concentração média de lactato para os voluntários que pertenciam ao grupo cafeína (2,75 mmol/L± 0,82) era semelhante à do grupo placebo (2,95 mmol/L ± 1,01). Após os tratamentos, as médias dos dois grupos não apresentaram alterações significativas: cafeína (3,04 mmol/L ± 0,92) e placebo (2,78 mmol/L ± 1,00). O limiar anaeróbico de lactato foi altamente correlacionado com o limiar de proteínas totais da saliva ($r =0.93$) na *fase A* do estudo. Na *fase B* essa correlação se manteve alta, porém o tratamento com cafeína provocou uma queda nessa correlação ($r = 0.84$), devido ao aumento na concentração de proteínas (figura 2).

**Óxido nítrico**

Os dados de NO estão sumarizados na figura 3. *Na fase A* do estudo, durante o teste no ciclo ergômetro, a produção de NO para os voluntários que pertenciam ao grupo placebo (329,67 μM ± 83,96) foi significativamente maior do que para os que pertenciam ao grupo cafeína (232,73 μM ± 41,75) ($p<0,01$). Porém, *na fase B*, após os tratamentos os voluntários que se submeteram à suplementação com cafeína aumentaram significativamente ($p<0.05$) a concentração de NO (337,15 μM ± 103,44), e o grupo placebo (142,83 μM ± 61,60) apresentou uma queda drástica na sua concentração.

**Desempenho físico**

Dos nove voluntários suplementados com cafeína, dois apresentaram indisposição à droga, como náuseas e tonturas no pós-exercício. Subseqüentemente, eles diminuíram seus tempos de exercícios. A média de

tempo total com os 9 voluntários não mostrou alteração significativa após a suplementação. Entretanto, quando se analisou o tempo para os outros sete voluntários que não apresentaram indisposição, a cafeína aumentou a média do tempo de exercício em 6% (1260 segundos fase A e 1340 segundos fase B) ($p<0.05$).

## DISCUSSÃO:

Este estudo examinou o efeito da ingestão de cafeína durante exercício intenso no cicloergômetro. Avaliou-se a produção de biomarcadores salivares como proteínas totais e óxido nítrico, lactato plasmático, bem como a correlação do limiar anaeróbico de lactato e o limiar salivar de proteínas totais; além do efeito no endurance até exaustão voluntária. Na *fase A* encontrou-se diferenças inter-individuais nas concentrações dos biomarcadores salivares entre os voluntários que participaram dos dois grupos. Na *fase B* observou-se aumento na produção de NO e na concentração de proteínas totais, ambos na saliva, após a suplementação com cafeína.

Na *fase A* do estudo encontrou-se uma maior produção de proteínas para o grupo placebo no pré-exercício. Na *fase B* do estudo, a ingestão de cafeína não alterou a concentração média de proteínas totais no pré-exercício, uma hora após sua ingestão, em indivíduos pré-hidratados. Em contraste, aumentou a concentração de proteínas totais significativamente durante o decorrer do teste incremental. No pré-exercício houve uma tendência da concentração de proteínas totais a ser maior, entretanto o aumento significativo ocorreu somente durante o teste A cafeína como um estimulante do sistema nervoso simpático, aumenta a secreção de epinefrina (JACKMAN et al.,1996; GRAHAM, HIBBERT e SATHASIVAN, 1998; LAURENT et al., 2000), produzindo inúmeras respostas metabólicas secundárias (GRAHAM, 2001). Uma dessas respostas seria a vasoconstricção dos vasos sanguíneos das glândulas salivares, que reduziria a secreção de água e aumentaria a secreção de proteínas da saliva (GARRET,

1999). O aumento na concentração de proteínas foi detectado com a ingestão da droga durante o teste no cicloergômetro.

No presente estudo identificou-se o PAT, a partir da concentração de proteínas totais na saliva. Uma alta correlação entre o limiar de lactato sanguíneo e o limiar de proteína totais da saliva tanto na *fase A* (r = 0.93) foi encontrada. Então, um limiar prediz o outro. Observa-se que embora a correlação na *fase B* também tenha sido alta a ingestão de cafeína alterou a correlação entre os dois limiares. Como a concentração de proteínas aumentou significativamente na saliva com a suplementação, e a de lactato não sofreu alteração, a curva de esforço na *fase B* foi menos coesa que na *fase A*. Estudos prévios realizados em nosso laboratório (BORTOLINI et al., 2005) mostraram que a concentração de proteínas totais da saliva apresentava uma curva de esforço semelhante à do lactato sanguíneo. Essa curva mostrava que os pontos de inflexão se sobrepunham. Outros estudos já haviam correlacionado limiares salivares com o AT, onde observaram que os primeiros aumentos contínuos na concentração de eletrólitos salivares, tais como, $Na^+$ e $Cl^-$ (CHICHARRO et al, 1994), e amilase salivar (CALVO et al, 1997) correspondia ao ponto de inflexão do lactato sanguíneo durante o exercício físico. Na *fase B* observou-se uma queda na correlação entre os dois limiares (r = 0.84) com a ingestão de cafeína, embora ela ainda tenha permanecido alta. Como a concentração de proteínas aumentou significativamente na saliva com a suplementação, e a de lactato não sofreu alteração, a curva de esforço na *fase B* foi menos coesa que na *fase A*., Porém, mesmo com essa queda na correlação pode-se dizer que à medida que o lactato sanguíneo sofreu uma elevação, deixando de ser linear e tendendo a exponencial (WASSERMANN E MELLROY, 1964), a concentração de proteína salivar também se elevou, mesmo após o aumento na sua concentração.

A cafeína é relacionada com a melhora no desempenho físico (JACKAMAN et al.,1996; GREER, FRIARS E GRAHAM, 200; GRAHAM, HIBBERT E SATHAVISAM, 1998). Em nosso estudo a média do tempo de exercício para o grupo total de nove voluntários na fase A, não foi significativamente diferente da

média da fase B, após a suplementação com cafeína. Dois dos nove voluntários que ingeriram a droga apresentaram náuseas e indisposição no pós-exercício e, consequentemente, não obtiveram um bom rendimento após a suplementação. Porém, a cafeína melhorou a média do tempo de exercício em sete dos nove atletas suplementados. Reações adversas como às encontradas nesse estudo já foram documentadas (GREER et al.,2000). Esses efeitos colaterais são próprios das diferenças individuais na sensibilidade à droga, e aos efeitos associados, como náuseas, tremores, ansiedade, e confusão que são desenvolvidas quando altas doses da droga são ingeridas (BELL E MCLELLAN, 2002). Portanto a cafeína é capaz de atuar como uma substância ergogênica, no sentido de melhorar o desempenho físico; porém, isto não seria aplicado a todos, já que alguns indivíduos apresentar efeitos colaterais que influencia na performance.

Os resultados deste estudo também indicam que a cafeína na dose administrada é um forte estímulo para a produção de NO (nitrito) na saliva, durante teste incremental no cicloergômetro. Na fase A do estudo o grupo placebo apresentou uma produção média maior de NO que o grupo cafeína, entretanto na *fase B* o grupo cafeína elevou sua concentração e o placebo diminuiu ambos significativamente. Essa queda na concentração de NO do grupo placebo, pode indicar uma adaptação ao teste. Panossian et al (1999) mostraram que atletas bem treinados exibiam níveis baixos de NO salivar, e que ele poderia ser um indicador da adaptação do organismo a exercício físico pesado. A freqüência cardíaca também apresentou uma queda significativa na *fase B*. Essa queda na freqüência foi observada nos dois grupos, o que indica que também houve uma adaptação no grupo que ingeriu cafeína. Entretanto, este grupo ao contrário do grupo placebo elevou a sua concentração de NO salivar. Esta elevação, provavelmente, foi devida a ingestão de cafeína. O NO é associado com mudanças benéficas na vasculatura e, o treinamento regular induz aumentos em sua produção. Estudos prévios revelaram que as taxas de NO expiradas se elevavam proporcionalmente à intensidade do exercício, até a exaustão (PERSON et al,1993; IWAMOTO et al., 1994); e que o exercício físico era um

estímulo para a produção de NO salivar (PANOSSIAN et al., 1999). Não encontramos outros estudos que avaliaram o efeito da ingestão de cafeína na produção salivar de NO durante o exercício físico. Porém, alguns examinaram a influência da cafeína na produção de NO em condições de repouso, onde a droga atuou como um estímulo para desenvolver a hiperatividade locomotora, a partir da síntese de NO (KAYR E UZBAY 2004) e, como um inibidor da atividade da L-arginase no cérebro, poupando L-arginina para ser utilizada em outras vias (NIKOLIC, BJELAKOVIC, STOJAMOVIC, 2003). Essa maior produção de NO observada em nosso estudo poderia ser própria da maior liberação de cálcio pela cafeína, já que ela em concentrações fisiológicas (< 75 μM) estimula a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (TARNOPOLSKY E CUPIDO 2000); ou mesmo do aumento no atrito de cisalhamento no vasos, devido ao aumento da pressão sistólica (ROBERTSON et al., 1978; SUNG et al 1990). Este atrito de cisalhamento é considerado um dos fatores mecânicos mais importantes para a liberação de NO (GATULLO, 1999), a partir da regulação da NOS (RANJAN, XIAO E DIAMOND 1995).

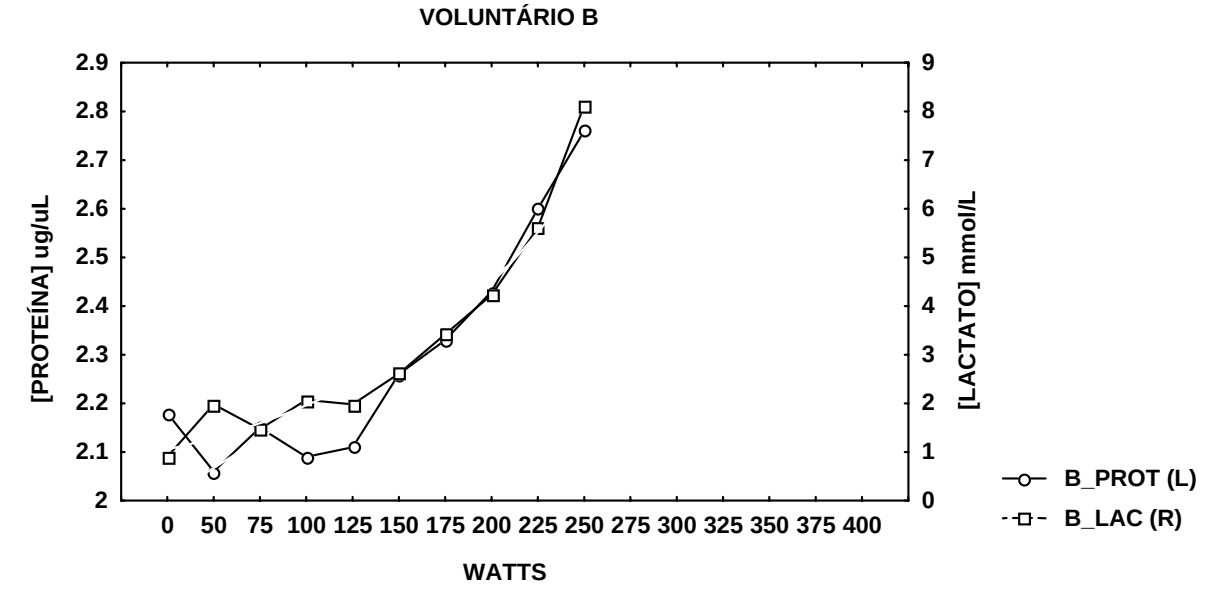
A melhora no desempenho físico encontrada neste estudo pode estar correlacionada com aumentos na produção de NO. De acordo com Hambrecht et al.(1998) melhoras no fluxo sanguíneo periférico são atribuidas à aumentos na formação e liberação de NO, em condições basais e após estimulação. Se considerarmos que o NO é um potente vasodilatador e que o efeito ergogênico da cafeína foi observado nos voluntários que não eram sensíveis à droga neste estudo, pode-se hipotetizar que a cafeína poderia atua na melhora do desempenho físico a partir também da produção de NO. Muitas são as teorias que trabalham com o efeito ergogênico dessa droga, como a inibição dos receptores de adenosina (DAVIS et al., 2003), que atualmente é a hipótese mais discutida e a economia do glicogênio muscular, que não tem encontrado subsídio na literatura (LAURENT et al., 2000). Se os efeitos vasodilatadores são potencializados com a ingestão de cafeína, a distribuição sanguínea é melhorada,

fornecendo um maior suprimento de substratos para os músculos em exercício, podendo assim retardar a fadiga.

Concluindo, o achado mais importante na *fase A* do estudo foi a grande diferença inter-individual na taxa de fluxo salivar e na concentração de proteínas totais, e a alta correlação entre os limiares AT e PAT. E, o achado mais importante da *fase B* foi o aumento na concentração de proteínas totais e NO na saliva, e a melhora na performance para os voluntários que não apresentaram indisposição com a ingestão de cafeína. Com o aumento na concentração de proteínas houve uma alteração na correlação dos limiares, porém ainda assim os dois limiares permaneceram altamente correlacionados. Pode-se concluir então, de acordo com nossos resultados que a cafeína é uma substância ergogênica, que atua no sentido de melhorar a performance e provoca aumentos na produção de NO, o que é altamente benéfico para a vasculatura. Entretanto, o seu uso não pode ser aplicado a todos, já que alguns apresentam efeitos colaterais após sua ingestão, podendo estes prejudicar a performance ao invés de melhorá-la. Novos estudos devem ser realizados para verificar se suplementações a longo prazo alteram as concentrações de óxido nítrico, e se isso traz benefícios a esses indivíduos suplementados. Outros biomarcadores salivares podem ser analisados para monitorar o exercício físico com a ingestão de cafeína.

## GRÁFICOS

**Figura 1 – curva de esforço AT e PAT**



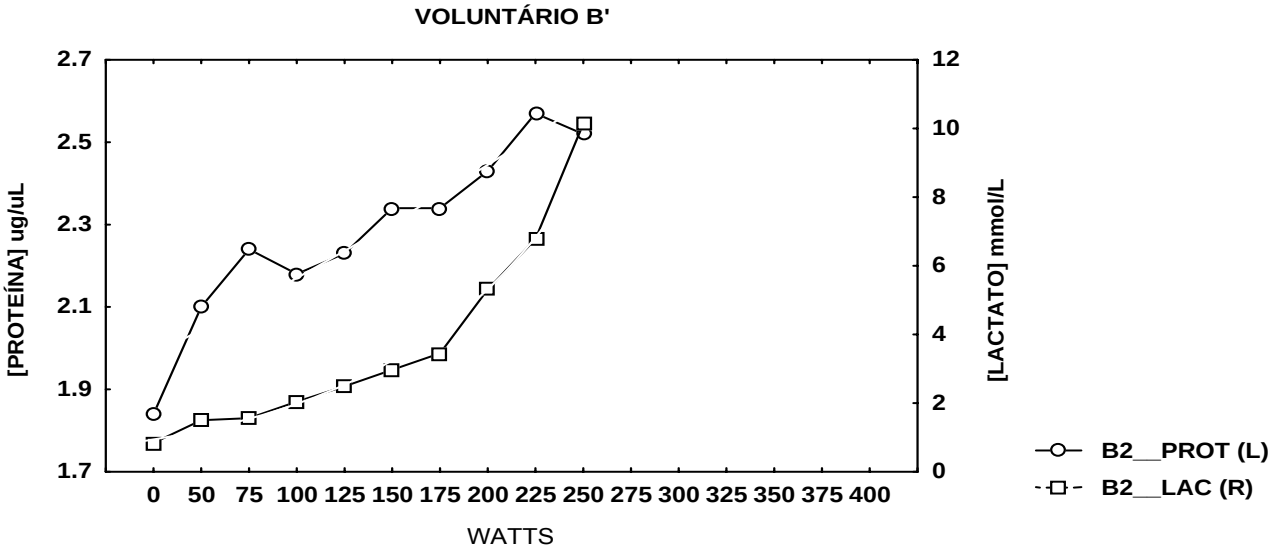



**Figura 2 – Correlação AT e PAT**

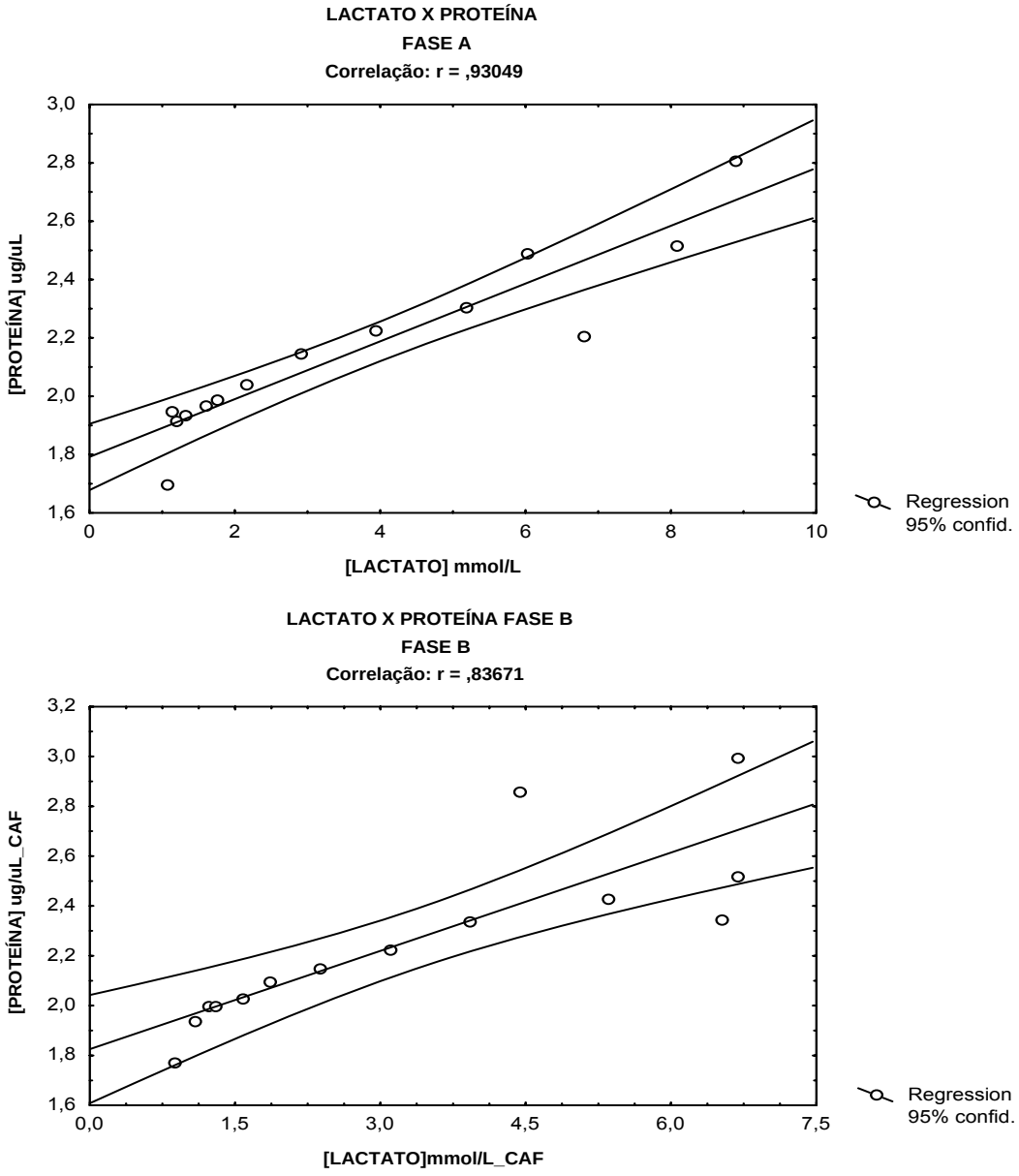
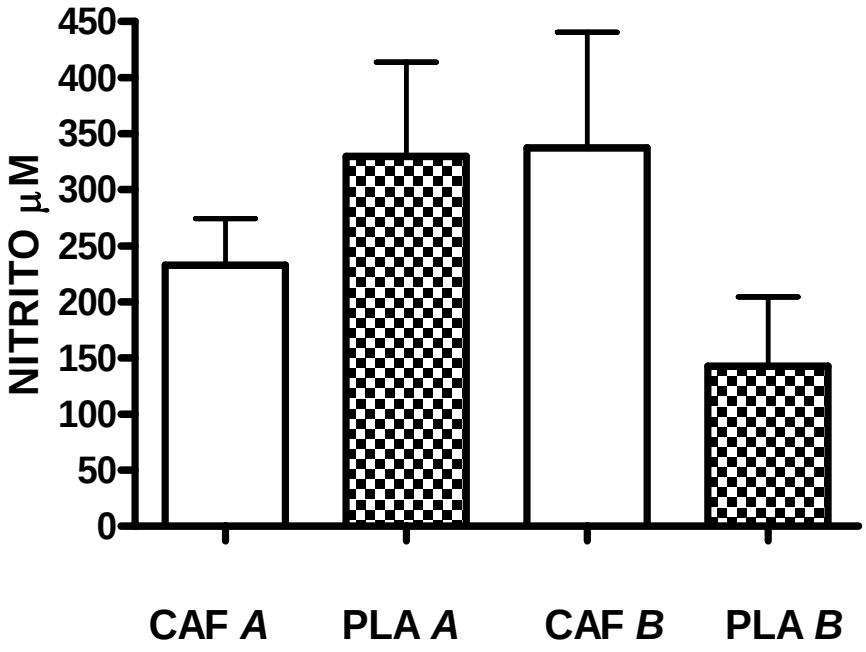


**Figura 3 – produção de NO.**



## LEGENDAS

Figura 1 - Efeitos da ingestão de cafeína na taxa de óxido nítrico (NO) salivar. Os valores são expressos pelas médias (± EP). Diferença na produção de NO drunte o teste entre os grupos na fase A, e após a suplementação na fase B.

Figura 2 – Curva de esforço de um voluntário representativo (B e B') dos limiares de lactato (LAC) e proteínas (PROT), após teste incremental no cicloergômetro em duas fases A e B. Suplementação de cafeína na fase B.

Figura 3 – Correlação entre os limiares de lactato e proteína nas fases A e B. Suplementação de cafeína na fase B.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. ESSIG, D.L., COSTILL, D.L., VAN HANDEL, P.J (1980). Effects of caffeine ingestion on utilization of muscle glycogen and lipid during leg ergometer cycling. *Int. J. Sports Med,* 1: 86-90.

2. JACKMAN, M., WENDLING, P., FRIARS, D., GRAHAM, T.E (1996). Metabolic, catecholamine, and endurance responses to caffeine during intense exercise. J *Appl. Physiol*, 81(4): 1658-1663.

3. DAVIS, J.M; ZHAO, Z; STOCK, H.S; MEHL, K.A; BUGGY, J; HAND, G.A (2003). Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Reul Integr Comp Physiol* 284: 399-404.

4. CONWAY, J.K; ORR, R; STANNARD, S.R (2003). Effect of a divided caffeine dose on endurance cycling performance, postexercise urinary caffeine concentration, and plasma paraxantine. *J Appl Physiol* 94: 1557-1562.

5. GRAHAM, T.E., SPRIET. L.L (1995). Performance and metabolic response to a high caffeine dose during prolonged exercise. *J Appl Physiol* 71: 2292-2298.

6. GRAHAM, T. E (2001). Caffeine and exercise. Metabolism, endurance and performance. *Sports med*, 31(11): 785-807.

7. COSTILL, D.L., DALSKY, G.P., FINK, W.J., LEBLANC, J (1978). Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance*. Med. Sci. Sports* 10: 155-158.

8. GREER, F.; FRIARS, D.; GRAHAM, T. E (2000). Comparison of caffeine and theophylline ingestion: exercise metabolism and endurance. *J Appl Physiol*, 89: 1837-1844.

9. LAURENT, D.; SCHNEIDER, K.E.; PRUSACZYK, W.K.; FRANKLIN, C.; VOGEL, S.M.; KRSSAK, M.; PETERSEN, K.F.; GOFORTH, H.W.; SHULMAN, G.I (2000). Effects of caffeine on muscle glycogen utilization and the neuroendocrine axis during exercise. *The journal of clinical endocrinology e metabolism,* 85(6): 2170-2175.

10. KALMAR, J.M; CAFARELLI, E (1999). Effects of caffeine on neuromuscular function. *J. Appl Physiol,* 87(2): 801-808.

11. PLASKETT, C.J.; CAFARELLI, E (2001). Caffeine increases endurance and attenuates force sensation during submaximal isometric contractions. *J Appl Physiol*, 91: 1535 – 1544.

12. MOUGLOS, V.; RING, S.; PETRIDOU, A.; NIKOLAIDIS, M.G (2003). Durantion of coffee and exercise-induced changes in the fatty acid profile of human serum. *J Appl Physiol,* 94: 476-484.

13. GREER, F; McLEAN, C; GRAHAM, T.E (1998). Caffeine, performance and metabolism during repeated wingate exercise tests. *J Appl Physiol*, 85(4): 1502-1508.

14. O'CONNOR, P.J., CORRIGAN, D.L (1987). Influence of short-term cycling on salivary cortisol levels. *Med. Sci. Sports. Exercise*, 28: 224-232.

15. GUILBAULT, G.G.; PALLESCHI, G (1995). Non-invasive biosensors in clinical analyses. *Biosensors and Bioelectronic*, 10: 379-392.

16. WALSH, N.P; BLANNIN, A.K; CLARK, A.M; COOK, L; ROBSON, P.J; GLEESON, M (1999). The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and α-amilase. *Journal of sports sciences*, 17: 129-134.

17. BISHOP, N.C; BLANNIN, A.K; ARMSTRONG, E; RICKMAN, M;GLEESON, M (2000). Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. *Medicine and science in sports and exercise*, 32 (12): 2046-2051.

18. WALSH, N.P; MONTAGUE, J.C; CALLOW, N; ROWLANDS (2004). Saliva flow rate protein concentration and osmolality as potencial markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Archives of Oral Biolog,* 49: 149-154.

19. PANOSSIAN, A. G.; OGANESSIAN, A. S.; AMBARTSUMIAN, M.; GABRIELIAN, E. S.; WAGNER, H.; WILMAN, G (1999). Effects of heavy physical exercise an adaptogens on nitric oxide content in human saliva. *Phytomedicine,* 6(1): 17-26.

20. CHICHARRO, J. L.; LEGIDO, J. C.; ALVARES, J.; SERRATOSA, L.; BANDRES, F.; GAMELLA, C (1994). Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic theshold determination. Kur- *J. Appl Phys*, Madrid. 68: 214-218.

21. CALVO, F.; CHICHARRO, J. L.; BANDRÉS, F.; LUCIA, A.; PERES, M.; ÁLVARES, J.; MOJARES, L. L.; VAQUERO, A. F.; LEGIDO, J. C (1997). Anaerobic threshold determination with analysisof salivary amylase. *Can. J. Appl. Physis.* 6 (22): 553-561.

22. PORT, K (1991). Serum and saliva cortiso responses and blood lactate accumulation during incremental exercise testing. *Int J Sports Med*. 12: 490-494.

23. BORTOLINI, M. A (2003). Biomarcadores Salivare do Exercício Físico para Determinação do Limiar Anaeróbico Humano. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia. 130p.

24. NATHAN, C., Q XIE (1994). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Fase J***,** 6:3051-3064.

25. FURCHOGOTT, R.F.; CHERRY, P.D.; ZAWAKZKI, J.V.; JOTHIANANDAN, D (1984). Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. J cardiovasc Pharm, 53: 557-573.

26. SIGEL, A.; SIGEL, H (1999). *Metal ions in biological system*. Vol 36.

27. HAMBRECHT, R., FIEHN, E., WEIGL, C., GIELEN, S., HAMANN, C., KAISER, R., YU, J., ADAMS, V., NIEBAUER, J., SCHULER, G (1998). Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heat failure. *Circulation,* 98: 2709-2715.

28. GOTO, C., HIGASHIM,Y., KIMURA, N., BINA, K., HARA, K., NAKAGAWA, K., KAWAMURA, M., CHAYAMA, K., YOSHIZAMI, M., NARA, I (2003). The effect of different intensities of exercise on endothelium- dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation,* 108: 530-535.

29. GRAHAM, D.A., RUSH, J.W (2004). Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol***,** 96:2088-2096.

30. MAEDA, S; MIYAUCHI, T; KAKIYAMA, T; SUGAWARA, J; IEMITSU, M; IRUKAYAMA-TOMOBE, Y; MURAKAMI, H; KUMAGAI, Y; KUNO, S; MATSUDA, M (2001). effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelium-1 and nitric oxide, in healthy young humans*. Life Sci*, 69: 1005 – 1016.

31. BODIS, S.; HAREGEWOIN, A (1993). Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva. *Biochemical and Biopysical research communications*. 194:347-350.

32. GRAHAM, T.E., HIBBERT, E., SATHASIVAM, P (1998). Metabolic and exercise endurance effects of coffee and caffeine ingestion. *J. Appl. Physiol,* 85(3): 883-889.

33. HARBERT, V.J.; SUTTON, J. R (1984). Endorphins and exercise. *Sports med*, 1: 154-171.

34. MOTL, T.W.; 'O CONNOR, P.J.; DISHMAN, R.K (2003). Effect of caffeine on perceptions of leg muscle pain during moderate intensity cycling exercise. *The journal of Pain*, 4(6): 316-321.

35. NATER, M.U; LA MARCA, R; FLORIN, L; MOSES, A; LANGHANS, W; KOLLER, M.M; EHLERT, U (2005). Stress-induced in human salivary alpha-amylase activity-associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrilology,* 20:1-10.

36. NAVAZESH, M (1993). Methods for collecting saliva. Annals of the New York Academy of Science, Saliva as a diagnostic fluid, 694: 72-77.

37. SHIP, J.A.; FICHER, D.J (1999). Metabolic indicators of hydration status in the prediction of parotid salivary-gland function. *Arch Oral Biol*, 44(4): 343 – 50.

38. GARRET, J.R (1999). Effects of autonomic nerve stimulation on salivary parenchyma and protein secretion. *Oral Biol*, 59-79.

39. WASSERMAN, K; MELLORY M (1964). Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *Am J Cardiol.* 14: 844-852.

40. BELL, D.G; McLELAN, T.M (2002). Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J. Appl Physiol*, 93(4): 1227-1234.

41. PERSSON, M.G., WIKLUND, N.P., GUSTAFSSON, L.E (1993). Endogenous nitric oxide in single exhalations and the chazige during exercise. *Am. Rev. Resp. Dis*. 148 (5): 1210-1214.

42. IWAMOTO, J., PENDERGAST, D.R., SUZUKI, H., KRASNEY, J.A (1994). Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans. *Respir.Physiol*. 97(3): 333-345.

43. KAYIR, H; UZBAY, T (2004). Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice*. Psychopharmacology*, 172: 11-15.

44. NIKOLIC, J., BJELAKOVIC, G., STOJANOVIC, I (2003). Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Molecular and cellular Biochemistry* 244: 125-128.

45. TARNOPOLSKY, M.; CUPIDO, C (2000). Caffeine potentiates low-frequency skeletal muscle force in habitual and nonhabitual caffeine consumers. *J Appl Physiol,* 89: 1719-1724.

46. ROBERTSON, D; FROLICH, J.C, CARR R.K; WATSON, J.T; HOLLIFIELD, J.W; SHAND, D.G; OATES, J.A (1978). Effects of caffeine on plasma rennin activity, catecholamines and blood pressure. *N Engl J Med.* 298: 181-186.

47. SUNG, B.H; LOVALLO, W.R; PICOMB, G.A; WILSON, M.F(1990). Effects of caffeine on blood pressure response during exercise in normotensive healthy young men. *Am J Cardiol,* 65: 909-913.

48. GATULLO, D; PAGLIARO, P; LINDEN, R.J; MERLETTI, A; LOSANO, G (1995). The role of nitric oxide in the initiation and in the duration of some vasodilators responses in the coronary circulation. Pflugers Ach, 430: 96-104.

49. RANJAN, V.; XIAO, Z.; DAMOND, S.L (1995). Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 269: H550 – H555.

## CONCLUSÃO GERAL

Há variações inter-individuais na taxa de fluxo salivar e na concentração de proteínas totais da saliva.

Os limiares anaeróbicos de lactato sanguíneo e proteínas totais foram altamente correlacionados indicando que um prediz o outro.

A cafeína ingerida uma hora antes do teste incremental atuou como ergogênico melhorando o desempenho físico, entretanto dois voluntários apresentaram indisposição no pós-exercício comprometendo seus rendimentos.

Os níveis dos dois biomarcardores salivares analisados, proteínas totais e óxido nítrico foram alterados, aumentando suas concentraçãoes durante o teste, após ingestão de cafeína. Contudo, as concentrações de lactato plasmáticos não apresentaram alterações com a suplementação.

A correlação entre os limiares anaeróbicos de lactato e proteínas sofreu uma pequena queda no teste em que se ingeriu cafeína. Isto ocorreu devido ao aumento na concentração de proteínas e ao não aumento na concentração de lactato.

# ANEXOS

## 1. Termo de consentimento livre

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Eu _____, RG _____, nascido em __/__/____e domiciliado à _____ município de _____, usuário (ou responsável legal pelo usuário _____ ), declaro que consinto em participar como voluntário do Projeto de pesquisa. “ESTUDO DE BIOMARCADORES SALIVARES E PLASMÁTICOS EM CICLISTAS E PRATICANTES DE *SPINNING* DURANTE EXERCÍCIO NO CICLOERGÔMETRO COM INCREMENTO DE CARGA, COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO DE CAFEÍNA” sob responsabilidade de Karina Estela Costa. Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que: a) o estudo será realizado no cicloergômetro com incremento de carga até exaustão, e serão coletadas amostras de saliva e sangue; b) o sangue será coletado a partir do lóbulo da orelha, sem nenhum desconforto, já que um pequeno furo disponibiliza a quantidade de sangue necessária para análise; c) a saliva será coletada para dosar a atividade da Amilase Salivar, Oxido Nítrico (NO) e proteínas totais; b) não haverá riscos à minha saúde, já que todos os materiais utilizados na coleta serão descartáveis e a coleta de saliva é altamente segura (nível de biosegurança I); c) no caso de algum imprevisto durante a realização dos testes terei atendimento médico gratuito, e se por ventura vier a me sentir mal pelo esforço realizado será fornecido um lanche para que me recupere normalmente; d)posso consultar o pesquisador em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone (0XX) 34 3218-2477, para esclarecimento de qualquer dúvida; e) estou livre para deixar a pesquisa a qualquer momento, não precisando apresentar justificativa para isso; f) todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em

sigilo e os últimos serão utilizados somente para divulgação em reuniões e revistas científicas; g) este estudo é importante para confirmar o paralelismo entre a curva de Lactato sangüíneo e a curva de proteínas totais durante o exercício e, também uma possível correlação entre NO salivar e avaliação da carga física. h) outras variáveis podem também estar sendo correlacionadas a proteínas totais e Óxido Nítrico Salivares durante o Exercício Físico, possibilitando assim reafirmar a proposta do paralelismo entre curva de lactato e proteínas e encontrar novos achados (analisando o NO); i) farei uma suplementação com cafeína no segundo teste para determinar um possível aumento desses biomarcadores salivares j) Estou ciente das atividades que irei fazer k) estou ciente que devo ser sincero ao responder a anamnese, dado ao respeito à pesquisa.

Assim, consinto em participar do Projeto de Pesquisa em questão.

_____, _____de _____ de _____.

_____ _____

Usuário/Responsável legal Pesquisador Responsável

**Obs**: Este termo apresenta-se em duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante legal e a outra ao Pesquisador.

Karina Estela Costa
Professora de Educação Física- Mestranda
Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica
Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular.
Endereço: Rua Acre - Bloco 2E39A – Campus Umuarama
CEP- 38400-982-Uberlândia- MG.

## 2. COLETA DE SALIVA NO TESTE ERGOMÉTRICO

**COLETA DE SALIVA EM 2 VOLUNTÁRIO SIMULTANEAMENTE**

**MATERIAL:**

1. 2 (duas) caixas de isopor com gelo;
2. guardanapos de papel;
3. 20 (vinte) eppendorfs de 1,5 mL resfriados e identificados;
4. 140 (cento e quarenta) eppendorfs de 0,6 mL resfriados e identificados;
5. 2 (duas) estantes abertas para eppendorfs;
6. 2 (duas) pipetas de 1.000 mL;
7. 20 (vinte) copinhos descartáveis de chá;
8. 2 (duas) toalhas de pano;
9. 2 (dois) descartes para ponteiras;
10. 2 (duas) caixas com ponteiras para pipeta;
11. 2 (dois) Becker para descarte;
12. 4 copos (200mL) descartáveis de água
13. goma de mascar (TRIDENT menta).

**SUBSTÂNCIA:**

1. 200 mL de água destilada ou deionizada;
2. saliva coletada.

**PROCEDIMENTOS:**

1. identificar os eppendorfs de 1,5mL com a sigla T00, T01, T02,...até o último estágio. Acima desta, identificar com a letra correspondente aquele voluntário.
2. Distinguir nos eppendorfs a análise que será realizada posteriormente AMY, NOX, ELE, PRO, GEL.
3. Para a realização da primeira coleta do teste: peça-lhes que enxágüem a boca com água destilada ou deionizada 3 vezes e, em seguida, dê a goma de mascar para o voluntário e o mesmo deve descartar a saliva durante 2 minutos em um descarte. Após isto, coleta-se a saliva durante três minutos em proveta graduada.
4. 30 segundos antes da troca de estágio do teste, o voluntário deve cuspir esta saliva.
5. Dado a falta de saliva durante o teste ergométrico, o voluntário deve começar a armazena a saliva logo após o passo acima, e 10 segundos antes da mudança de estágio ele deve dar a 1ª cuspida, continuar mascando o chicletes e 5 segundos após a mudança de estágio ele deve cuspir novamente (não engolindo nada de saliva).
6. Após cada coleta colocar a saliva no eppendorf já identificado e resfriado;

**Para a análise da saliva:**

1. Centrifugue a saliva de acordo com o recomendado (10 minutos; 4ºC; 1500g ou a 14000g de acordo com os testes);
2. Retire o sobrenadante para cada amostra e aliquotando-os em 6 (seis, se possível) eppendorfs de 0,6mL (previamente identificados como no item 2);
3. Todas amostras serão aliquotadas, quando o volume for suficiente , em sete partes: 1ª Óxido Nítrico (150µL); 2ª Proteína total (80µL).
4. Armazene no freezer (a –80 ºC ou a –20 ºC);

**OBS.:** manter o rosto do voluntário sempre seco e limpo usando a toalha limpa, para não haver possível contaminação da saliva na coleta.

## 3. ANÁLISE DO ÓXIDO NÍTRICO NA SALIVA

**ANÁLISE PARA 39 AMOSTRAS EM DUPLICATA**

**Material:**

1. 1 tubos de 6 mL;
2. 1 placa de ELISA;
3. pipeta de 100 μL;
4. suporte para tubos de 6 mL;
5. caixa de isopor com gelo;
6. espectrofotômetro (deve ser ligado 15 minutos antes);
7. ponteiras para pipeta;
8. descarte para ponteiras da pipeta;
9. agulha descartável.

**Substâncias**:

1. 15 mL de água destilada ou deionizada;
2. n-nafitil-etileno-dihidroxicloreto (NEED) a 0,1%;
3. 100 µL (0,10 mL) de saliva;
4. ácido fosfórico a 2,5%;
5. sulfanilamida a 1%;
6. 0,069 g nitrito de sódio (NaNO2);
7. 10 mL água destilada ou deionizada.

**Preparação de solução-estoque:**

**Materiais**:

1. 2 provetas de 25 ou 50 ml;
2. balança;
3. espátula;
4. 2 vidros vazios.
5. 2 Pratinho de plástico.

**Substâncias**:

1. Sulfanilamida P.M. 172,21(Sigma) $C_6H_8N_2O_2S$
2. N-(1-Naphthyl) ethyl-ene Diamine. (NEED) P.M.= 259,2 (Sigma)
3. Ácido Fosfórico à 2,5%.

**Procedimento de calculo**:

Para preparar 20ml de ac. Fosfórico à 2,5% com Sulfidrilamina à 1%

1g (Sulfidrilamina) - 100mL

X - 20mL

**X= 0,2g**

Para preparar 20ml de ácido fosfórico a 2,5% com NEED 0,1%

0,1g (NEED) - 100ml

Xg - 20ml

**X=0,02g**

Para preparar 1mL NaNO2 a 1M (solução estoque)

M(g)= PM (massa atômica) . V(Litro) . M(molaridade)

M = 69 . 0,001L . 1M

**M = 0,069** gramas(1ml de água deionizada)

**Procedimentos:**

1) Ligar o espectrofotômetro 15 minutos antes do início da análise;
2) Descongelar a saliva em temperatura ambiente;
3) Preparar curva padrão(P1=400 $\mu$M) de nitrito a partir da solução estoque: $NaNO_2$ a 1 M (1.000 mM);:

Diluição de 1M para 10 mM

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

10 mM x 600 µL = 1000 mM x $V_2$

$V_2$ = 6 µL

6 µL de $NaNO_2$ + 594 µL de água deionizada mM

Diluição de 10mM para 400 µM

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

0,4 mM x 1.000 µL = 10 mM x $V_2$

V2 = 40 µL

40 µL de NaNO2 + 960 µL de água deionizada

(10 mM)

4) Colocar 50 µL da solução $NaNO_2$ a 400 µM (0,4 mM) nos poços 1A e 1B da placa de ELISA;

   a) Colocar 100 µ L da solução $NaNO_2$ a 400 µM (0,4 mM) nos poços 2A e 2B da placa de ELISA;
   b) Colocar 50 µL de água deionizada nos poços 3A a 8A e 3B a 8B da placa de ELISA;
   c) Fazer diluição de ordem 2 a partir dos poços 2A e 2B até 8A e 8B, ao final descartar 50 µL dos poços 8A e 8B.
   d) Colocar 50 µL de água deionizada nos poços 9A e 9B;

5) Colocar 50 µL de saliva até 39 amostras em duplicata, nos restantes dos poços (exceção 1A a 9A e 1B a 9B);

6) Preparar o reagente de GRIESS:
   a) Colocar em tubo de 6 mL 50% do volume final do reagente de GRIESS de sulfanilamida a uma concentração de 1% e 50% do volume final do reagente de GRIESS de NEED a concentração de 0,1%.
   b) **Obs.:** de acordo com o número de amostras calcular a quantidade deste reagente, preparando sempre aproximadamente 400-1000µL a mais;

7) Colocar 50% do reagente de GRIESS em todos os poços começando pelos 9A e 9B (controle), 1A, 1B, 2A, 2B, assim sucessivamente até 8A e 8B (curva) e nos poços em que houver saliva começando sempre da original para duplicata correspondente.
8) Leia a placa de ELISA imediatamente no espectrofotômetro a 570nm duas vezes consecutivas.

**Obs.:** dê leves toques na placa para que os reagentes se misturem até que toda solução fique no fundo do poço. Caso haja bolhas retire-as com uma agulha descartável.

**9)** Digite os dados da leitura mais confiável para o Software "**Microplate"**.

## 4. ANÁLISE DE PROTEÍNA

(BRADFORD, 1976)

**Preparação do Reagente de Bradford**:

1. 100 mg de Comassie Blue G;
2. 50 mL de Etanol 95%;
3. 100 mL de Ácido Orto-fosfórico;
4. Completar para 1000 mL com $H_2O$ deionizada.

**Substâncias**:

1. BSA deionizada (Soro Albumina Bovina);
2. $H_2O$ (de acordo com a curva);
3. Reagente de Bradford;
4. Amostra alvo.

**Material**:

1. caixa de isopor com gelo;
2. tubos de 6mL (de acordo com o n de amostra)
3. pipetas de 10 mL e 100 mL;
4. suporte para tubos;
5. dispensador;
6. pisseta com água;
7. cubeta;
8. papel higiênico;
9. Espectrofotômetro (ligar 15min antes);
10. Cubeta;

11. Papel Higiênico;

**Procedimentos:**

1. Ligar espectrofotômetro 15 minutos antes do início da análise;
2. Identificar os tubos de 6 mL;
3. Descongelar a saliva em temperatura ambiente;
4. Preparar a curva padrão de BSA em duplicata (ver tabela abaixo); obs: não adicionar o reagente ainda;
5. Colocar 30 µL de saliva nos tubos correspondentes;
6. Preparo da curva padrão;
    a. coloque a água nos tubos previamente identificados;
    b. coloque o BSA nos tubos correspondentes.
7. Colocar de 30 µL de saliva, em duplicata, nos tubos correspondentes.
8. Colocar o reagente de *Bradford*, começando pelo controle; P1, P2, P3, P4, P5, P6, sucessivamente nas amostras; e suas duplicatas com um intervalo de 40 minutos entre cada tubos.

Ler no espectrofotômetro a 595nm de 9'-11'(maior atividade do reagente). Porém, ao ler a primeira, as outras terão que ser lidas com o mesmo intervalo tempo da colocação das amostras (40" segundos).