



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DO DESPORTO E EDUCAÇÃO FÍSICA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

Matheus Uba Chupel

**EFEITOS DO EXERCÍCIO PROLONGADO COM E SEM IMPACTO AXIAL EM
LESÕES NA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E EM MARCADORES
PERIFÉRICOS DE FADIGA CENTRAL**

COIMBRA
2013



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DO DESPORTO E EDUCAÇÃO FÍSICA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

Matheus Uba Chupel

**EFEITOS DO EXERCÍCIO PROLONGADO COM E SEM IMPACTO AXIAL EM
LESÕES NA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E EM MARCADORES
PERIFÉRICOS DE FADIGA CENTRAL**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências do Desporto e Educação
Física da Universidade de Coimbra,
para obtenção de grau de Mestre em
Biocinética

**Orientador: Professor Doutor Alain Guy Marie Massart
Co-Orientadora: Professora Doutora Ana Maria
Miranda Botelho Teixeira**

COIMBRA
2013

Uba Chupel, M. (2013) Efeitos do Exercício Prolongado com e sem impacto axial em Lesões na Barreira Hematoencefálica e em Marcadores Periféricos de Fadiga Central. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, repito o agradecimento que faço todos os dias a Deus, por abençoar meu caminho durante toda minha vida, e proporcionar-me Força de Vontade pra continuar lutando pelo que acredito. Estendo o agradecimento a minha Família, Amigos, Colegas e Alunos no Brasil, que marcaram de maneira significativa todos os momentos de minha vida. Igualmente, agradeço às grandes amizades que fiz aqui (em Portugal), além da hospitalidade fantástica que aqui tive – e que tão importantes foram para minhas realizações.

Por intermédio da pessoa que me recebeu no curso, a coordenadora do Mestrado em Biocinética Professora Dr^a Paula Tavares, agradeço a todos os Professores que colaboraram ao longo das aulas, pois todo o conhecimento aqui adquirido será uma componente chave nas realizações (pessoais e profissionais) a ter lugar no futuro. Obviamente, enalteço agradecimentos a meus orientadores: Professor Dr. Alain Massart que, definitivamente, foi mais do que um orientador, tornando-se para mim um exemplo de pessoa, de bom caráter, além de um amigo formidável que permanecerá para sempre. Da mesma forma, agradeço à Professora Dra. Ana Teixeira, pelos importantes ensinamentos e oportunidades a mim ofertadas durante este período, as quais geraram conhecimentos práticos que serão aplicados durante toda minha carreira.

Vale lembrar também da equipe e demais colegas que muito ajudaram nesse período, a constar: Dr. Elói Quege, meu chefe no Brasil, por todas as oportunidades a mim ofertadas como pessoa e como profissional. À minha equipe de trabalho durante a coleta de dados (Fátima Rosado, Sandra Pereira, Carina Martins, Rita Fernandes e José Lelis) pela extraordinária ajuda que proporcionaram.

Ao mesmo tempo, estendo agradecimentos às pessoas que ajudaram na realização deste trabalho e, especialmente, cito aqui o Professor Dr. Luís Rama (pela articulação com a Federação Portuguesa de Triatlo), ao Lino Barruncho (Técnico do Triatlo), bem como a todos os Triatletas que voluntariamente participaram desta pesquisa. E finalmente, um sincero agradecimento ao auxílio e disponibilidade da Professora Dra. Edith Filaire (Université Orléans), que confiou em mim e colaborou desde a concepção do projeto de investigação, até o financiamento de boa parte das análises realizadas no decorrer do processo (“Merci Beaucoup”).

De forma geral, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho tão importante.

Muito Obrigado!

RESUMO

A síntese das monoaminas e das catecolaminas no cérebro possuem papel muito importante durante o exercício prolongado. Nesse caso, a maior atividade do sistema serotoninérgico tem sido ligada à instalação da fadiga central e, atualmente, reconhece-se que a barreira hematoencefálica desempenha um papel chave na interação entre o transporte dos precursores e a síntese do neurotransmissor. Estudos já apontaram também que a estrutura da barreira hematoencefálica pode ser comprometida durante a prática de alguns exercícios, porém, ainda é necessário saber se estas alterações são capazes de modular a atividade do sistema serotoninérgico durante a atividade. O objetivo deste trabalho é verificar as associações existentes entre lesões na barreira hematoencefálica e marcadores periféricos de fadiga central, induzidas por exercício prolongado. **Metodologia:** oito triatletas treinados (n=8) do sexo masculino, com idades de $19,87 \pm 2,29$ anos, realizaram dois protocolos na mesma intensidade relativa de esforço. O exercício contínuo, prolongado (40 minutos) foi realizado em intensidade estipulada em 75% do $VO_{2máx}$, no primeiro momento em cicloergômetro e, em outro momento, em corrida. Foram coletadas amostras de sangue e saliva, antes e após cada protocolo, para análise de S100-B, Prolactina, Cortisol e Deidroepiandrosterona (DHEA). **Resultados:** o valor médio do hormônio Cortisol detectado na saliva foi maior após a realização do exercício de ciclismo relativamente aos valores médios basais, porém, esta diferença não foi significativa ($p=0,123$), sendo que os valores pós-corrida para o mesmo hormônio permaneceram inalterados comparativamente ao repouso. O DHEA exibiu um aumento significativo após os exercícios, tanto em cicloergômetro ($p=0,012$) quanto em corrida ($p=0,025$). A análise de S100-B no soro não demonstrou alterações significativas em nenhuma das situações experimentais. No entanto, os índices de prolactina aumentaram expressivamente após corrida ($p=0,012$), e um sutil e insignificante aumento foi observado após ciclismo ($p=0,123$). **Conclusão:** os índices de S100-B, marcador de lesão na barreira hematoencefálica, não foi diferente entre as atividades que envolveram impacto axial (corrida) da atividade de ciclismo (sem impacto). Nesse sentido, sugerimos que o protocolo utilizado (principalmente em corrida) produziu efeitos significativos nos marcadores de fadiga central, sem interferir na permeabilidade da barreira hematoencefálica.

ABSTRACT

The synthesis of monoamines and catecholamine in the brain have very important role during prolonged exercise. In this case, the major activity of the serotonergic system has been connected with the phenomenon of central fatigue and, currently, it is acknowledged that the blood-brain barrier plays a key role in the interaction between the transport of precursors and the synthesis of the neurotransmitter. Studies have also pointed out that the structure of the blood-brain barrier can be compromised during the practice of some exercises, however, it is still necessary to know if these changes are able to modulate the activity of the serotonergic system during activity. The aim of this study is to verify the existing associations between blood-brain barrier leakage and peripheral markers of central fatigue induced by prolonged exercise.

Methods: eight male trained triathletes ($n = 8$) with a mean age of 19.87 ± 2.29 years conducted two protocols in the same relative intensity of effort. The continuous, prolonged exercise (40 minutes) was conducted in 75% of VO_{2max} in cycle ergometer at first and, later in the run. Blood and saliva samples were collected, before and after each protocol for examination of S100-B, Prolactin, Cortisol and DHEA. **Results:** the mean value of the salivary cortisol was greater after the cycling exercise in relation to the average basal values, however, this difference was not significant ($p = 0.123$), post-race values for the same hormone remained unchanged compared to baseline. DHEA exhibited a significant increase after the both exercises, in cycle ergometer ($p = 0.012$) and race ($p = 0.025$). The analysis of S100-B in serum did not show significant changes in any of the experimental situations. However, prolactin increased significantly after the race ($p = 0.012$), and a subtle and insignificant increase was observed after cycling ($p = 0.123$).

Conclusion: the S100-B (injury marker in the blood-brain barrier), was not different between the exercises involving axial impact (run) and cycling (no impact). Accordingly, we suggest that the protocol used (mainly in run) produced significant effects on markers of central fatigue, without interfering in the permeability of the blood-brain barrier.

Lista de Abreviaturas

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico

AN - Aminoácidos Neutros

BHE - Barreira Hematoencefálica

DA - Dopamina

DHEA - Deidroepiandrosterona

FIP - Fatores Inibidores de Prolactina

FLP - Fatores de Liberação de Prolactina

GFAP - Proteína Glial Fibrilar Ácida

JF - Junções Fechadas

LCT - Lesões Cerebrais Traumáticas

MHPG - 3-metoxi-4-hidroxifenil-glicol

NSE - Enolase Neuronal-Específica

PRL - Prolactina

SNC – Sistema Nervoso Central

TRP - Triptofano

5-HT - Serotonina

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização da Amostra do Estudo	35
Tabela 2. Efeito do Exercício sobre as variáveis bioquímicas Cortisol e DHEA	36
Tabela 3. Efeito do Exercício sobre os níveis de S100B e Prolactina	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo sugestivo pelo qual o Exercício pode promover disfunções na Barreira Hematoencefálica	16
Figura 2. A Biossíntese das Catecolaminas.....	18
Figura 3. Mecanismo sugestivo de liberação da Prolactina mediada pelo estímulo aos Receptores Serotoninérgicos.....	21

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Percepção Subjetiva de Esforço (Escala de Borg)	35
Gráfico 2 Representação dos valores médios de Cortisol em Cicloergômetro e Corrida.....	36
Gráfico 3 Representação dos valores médios de DHEA em Cicloergômetro e Corrida.....	37
Gráfico 4 Representação dos valores médios (basais e pós-exercício) de S100B em Cicloergômetro e Corrida	38
Gráfico 5 Representação dos valores médios (basais e pós-exercício) de Prolactina em Cicloergômetro e Corrida	39

ÍNDICE GERAL

1.....INTRODUÇÃO	12
2.....ESTADO DA ARTE.....	14
2.1 A Barreira Hematoencefálica.....	14
2.1.1 Marcadores utilizados para monitorizar a integridade da BHE	15
2.3 Exercício Físico e Disfunção da BHE – quais os mecanismos envolvidos?	15
2.4 Interação entre Barreira Hematoencefálica e Síntese de Neurotransmissores - como ocorre este processo?	17
2.5 Fadiga Central – da síntese das Monoaminas e Catecolaminas aos marcadores periféricos.....	19
2.5.1 Exercício Prolongado e Prolactina.....	20
2.5.2 As Catecolaminas e o Exercício Prolongado – Noradrenalina, Dopamina e suas relações com a Fadiga Central	23
2.6 A Determinação salivar de Hormônios envolvidos no Exercício – Cortisol e Deidroepiandrosterona (DHEA)	24
3.....OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4.....PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	28
4.1 Delineamento	28
4.2 População e Amostra	28
4.3 Instrumentos de Medida	28
4.4 Teste Máximo em Cicloergômetro.....	29
4.5 Teste Máximo em Tapete Rolante.....	29
4.6 Testes Experimentais	30
4.6.1 Teste Experimental – Cicloergômetro	30
4.6.2 Teste Experimental – Corrida.....	30

4.7	Coletas de Sangue e Saliva	31
4.8	Equipamentos para preparação das amostras bioquímicas	31
4.9	Procedimentos para Análise das Amostras	32
4.9.1	Prolactina	32
4.9.2	S100B	32
4.9.3	Cortisol	33
4.9.4	Deidroepiandrosterona (DHEA).....	33
4.10	Cálculo das Concentrações nas Amostras.....	34
4.11	Procedimento Estatístico para Aquisição dos Dados	34
5.....	RESULTADOS	35
5.1	Percepção Subjetiva do Esforço após o Exercício	35
5.2	Resultados dos Marcadores Bioquímicos	36
6.....	DISCUSSÃO	40
7.....	CONCLUSÕES	46
7.1	Sugestões para Futuros Estudos	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

A síntese das monoaminas e das catecolaminas no cérebro, tem sido ligadas à instalação da fadiga central. De maneira geral, pode-se dizer que vários neurotransmissores estão ligados a este processo e, sendo que recentes evidências sugerem que alterações na permeabilidade estrutural da Barreira Hematoencefálica (BHE), uma possível disfunção desta estrutura pode estar envolvida na alteração da síntese destes hormônios.

Ao mesmo tempo, durante as últimas décadas, emergiram estudos que evidenciaram a influência de hormônios como o cortisol (reconhecidamente catabólico, caracterizado como hormônio do stress) e dehidroepiandrosterona (DHEA) de predominância anabólica. A determinação das concentrações, bem como a razão existente entre Cortisol/DHEA, pode auxiliar na compreensão da resposta do stress associada ao exercício. No entanto, ainda necessita ser melhor investigado como a interação ocorre durante um protocolo contínuo de longa duração, sendo ainda necessário discutir se variáveis como duração e intensidade de exercício estão envolvidas nessa relação.

Através de pesquisas envolvendo a prática de exercícios, realizados com diferentes configurações e em áreas como medicina, biologia, fisiologia e psicologia, verificou-se que este estímulo é capaz de alterar variadas funções do organismo e, ao mesmo tempo, de envolver um papel chave no metabolismo cerebral. Todavia, um dos fatores negativos que atualmente é pesquisado na fisiologia médica e do exercício trata das lesões na BHE, que são originadas por diferentes fatores que podem possuir gênese na prática de algumas modalidades desportivas. O metabolismo cerebral - que está ligado à instalação da fadiga central - pode estar envolvido e diretamente relacionado à alteração na permeabilidade da BHE. Atualmente, reconhece-se que os fatores causadores de danos à BHE podem interagir ou atuar isoladamente, promovendo a permeabilidade dessa estrutura sob condições de stress. Estudos verificaram também maior disfunção e permeabilidade da BHE nas situações onde processos neurodegenerativos são observados (Jeynes e Provias, 2011; Desai *et al.* 2007), mas os mecanismos de interação entre as causas destas lesões à instalação das doenças neurodegenerativas (p.ex: doença de Parkinson e doença de Alzheimer) ainda necessita ser melhor investigado. Evidências apontam também que a realização de alguns tipos de modalidades desportivas, principalmente as que envolvem impactos na cabeça (Otto *et al.* 2000) ou as realizadas em ambientes quentes (Watson *et al.* 2005), são responsáveis pelo aparecimento de lesões na BHE. Ao mesmo tempo, o estudo em torno destes danos interessam às pesquisas em fisiologia do exercício, uma vez que a BHE é sugerida como um componente chave no processo de instalação da fadiga central durante atividades prolongadas. Todavia, a hipótese do envolvimento de lesões da BHE oriundas da prática de exercício prolongado (principalmente aplicados à protocolos de campo), e se essas lesões são capazes de interferir na síntese de alguns neurotransmissores ainda não foi estudada sistematicamente.

Mesmo tendo em conta que o fenômeno da fadiga central é modulado pela síntese de vários neurotransmissores - e não apenas a serotonina (Meeusen *et al.* 2006), é consensual afirmar que a atividade do sistema serotoninérgico durante o exercício prolongado é um dos fatores chave para

desencadear esse fenômeno. Ao mesmo tempo que a síntese de serotonina é dependente da disponibilidade de triptofano (Fernstrom, 2005), e que a entrada do triptofano no cérebro pode ser dependente do adequado funcionamento dos canais de transporte da BHE (Hawkins *et al.* 2006), é interessante levantar a hipótese de que atividades que envolvem impacto axial (possíveis de causar danos estruturais à BHE) podem promover também maior atividade serotoninérgica central.

Dado a dificuldade em acessar a integridade da barreira hematoencefálica e a concentração de serotonina cerebral por métodos diretos, marcadores periféricos são utilizados para verificar os danos na estrutura e os índices desse neurotransmissor, respectivamente. Nesse caso, assumem um papel primordial a proteína S100B que, recentemente, tem sido apontada como um marcador de acurácia fiável para verificar o estado de permeabilidade da BHE (Blyth *et al.* 2009). Respectivamente à verificação da atividade central do sistema serotoninérgico, a determinação da concentração sérica de prolactina (PRL) tem recebido cada vez mais atenção, uma vez que o aumento da concentração desse hormônio no sangue pode refletir a síntese de serotonina cerebral durante um exercício (Rojas Vega, 2012).

A atraente idéia de que síntese de neurotransmissores contribuintes na instalação da fadiga central pode ser modulada pela permeabilidade da BHE, suscita-nos a investigar como estas interações podem acontecer durante uma atividade realizada com e sem impacto axial. Para tal, sugere-se algumas hipóteses, sendo que a primeira delas diz respeito a:

- A possibilidade de que o exercício de corrida eleve mais significativamente os níveis de S100B, indicando possível lesão na BHE, comparativamente ao protocolo em cicloergômetro;
- sendo confirmada a primeira hipótese, é possível que os níveis de prolactina elevem-se mais após corrida do que ciclismo – e que este marcador possa estar relacionado com a S100B;
- as concentrações salivares de cortisol e DHEA poderão ser significativamente mais elevadas após a realização dos dois protocolos.

Em função disso, o objetivo deste trabalho é verificar as associações existentes entre lesões na BHE e marcadores periféricos de fadiga central, induzidas por exercício prolongado com e sem impacto axial.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 A Barreira Hematoencefálica

Os efeitos benéficos da atividade física e do exercício físico são muito bem conhecidos, sendo evidentes as melhorias no sistema imune (Navarro *et al.* 2010; Haaland *et al.* 2008), cardiovascular (Agarwal, 2012) e em distúrbios como a depressão (Trivedi *et al.* 2006; Milani *et al.* 2011). Porém, não há muito tempo ficaram expostos os males que podem afetar o organismo quando este é submetido a uma carga intensiva de treinamento e, nesse sentido, durante as últimas décadas, emergiram alguns trabalhos que tratam exatamente do efeito “danoso” que o exercício pode assumir, quando não levados em conta os fatores de risco associados à sua prática. Um desses fatores fortemente associados a danos ao organismo diz respeito à prática de exercícios com impactos, colisões, e quedas consequentes, pois estes eventos geralmente estão associados a Lesões Cerebrais Traumáticas (LCT).

Partindo deste princípio, uma estrutura que assume um papel chave no controle de muitas funções cerebrais, e que pode ser vulnerável às injúrias de algumas práticas desportivas, é a Barreira Hematoencefálica (BHE).

A barreira hematoencefálica é uma membrana lipofílica localizada entre as células endoteliais cerebrais que estão conectadas por junções fechadas (JF) (*tight junctions*), não permitindo qualquer fluxo em massa de água e solutos (Paulson, 2002). O termo "barreira hematoencefálica" foi cunhado por Lewandowsky, que observou que compostos neurotóxicos levaram à morte celular neuronal somente se aplicados diretamente no cérebro, mas não após injeção sistêmica na circulação vascular (Liebner *et al.*, 2011).

Estas estruturas são essencialmente responsáveis pela restrição e controle do fluxo paracelular entre as células epiteliais e endoteliais (Liebner *et al.*, 2011). A causa da baixa permeabilidade da BHE é a maneira pela qual as células endoteliais dos capilares se unem umas às outras, formando as JF. As membranas endoteliais adjacentes estão intimamente fundidas umas às outras, em vez de apresentar extensos poros em forma de fendas entre si, como é o caso da maioria dos outros capilares do corpo (Guyton e Hall, 1996). As alterações em sua permeabilidade (Biron *et al.* 2011; Starr *et al.* 2009), bem como a modulação e deterioração das junções fechadas (Cioni *et al.* 2012; Feng *et al.* 2011), estão associadas a disfunções da BHE.

A deterioração da BHE devido à ruptura das junções fechadas altera o transporte de moléculas entre o sangue e o cérebro e cérebro e sangue, sendo que importantes fatores como hipoperfusão do cérebro e as respostas inflamatórias ocasionadas, podem iniciar ou contribuir

para um “círculo vicioso” (Zlokovic, 2008) na gênese de inúmeras doenças neuronais. Uma série de distúrbios associados pode resultar em progressiva disfunção sináptica e neuronal, desencadeando processos neurodegenerativos como doença de Alzheimer (Jeynes e Provias, 2011), doença de Parkinson (Desai *et al.* 2007), esclerose amiotrófica lateral (Garbuzova-Davis *et al.* 2011), epilepsia (Friedman e Heinemann, 2012; Weissberg *et al.* 2011), esclerose múltipla, e outras (Zlokovic, 2008).

Porém, ainda está longe de ser totalmente compreendida como estas associações acontecem e se, eventualmente, a prática de exercícios pode comprometer/interagir com estes processos em nível cerebral de maneira crônica. A BHE, nesse caso, pode assumir um papel chave no controle da síntese de alguns hormônios cerebrais, além de que sua integridade/permeabilidade pode sofrer interferências pela prática de exercícios, conforme modelo apresentado na Figura 1.

2.1.1 Marcadores utilizados para monitorizar a integridade da BHE

Dado a dificuldade em acessar a integridade das barreiras cerebrais diretamente, principalmente nos estudos em humanos, alguns marcadores periféricos são comumente utilizados para verificar danos nestas estruturas e, nesse caso, assumem papel de destaque a proteína S100B, a enolase neuronal-específica (NSE – *neuron specific enolase*) e a proteína glial fibrilar ácida (GFAP – *glial fibrillary acidic protein*) (Marchi *et al.* 2003). O uso de marcadores periféricos como T-Tau (Bulut *et al.* 2006), e proteínas de neurofilamentos leves (NFL – *neurofilament light protein*) (Khalil *et al.* 2012) também foram utilizados para investigação de danos neuronais em distúrbios neurodegenerativos. A análise de biomarcadores do fluido cefalorraquidiano pode ajudar a entender a patologia das lesões traumáticas cerebrais ao nível celular, podendo também desempenhar um papel chave na prática clínica (Neselius *et al.* 2012).

Comparativamente a outros marcadores, a utilização da proteína S100B possui acurácia (precisão) fiável, relativamente não invasiva, para acessar o estado da permeabilidade da BHE (Blyth *et al.* 2009), conforme pode ser inferido em alguns trabalhos (Marchi *et al.* 2003; Ingebrigtsen e Romner, 2003).

2.3 Exercício Físico e Disfunção da BHE – quais os mecanismos envolvidos?

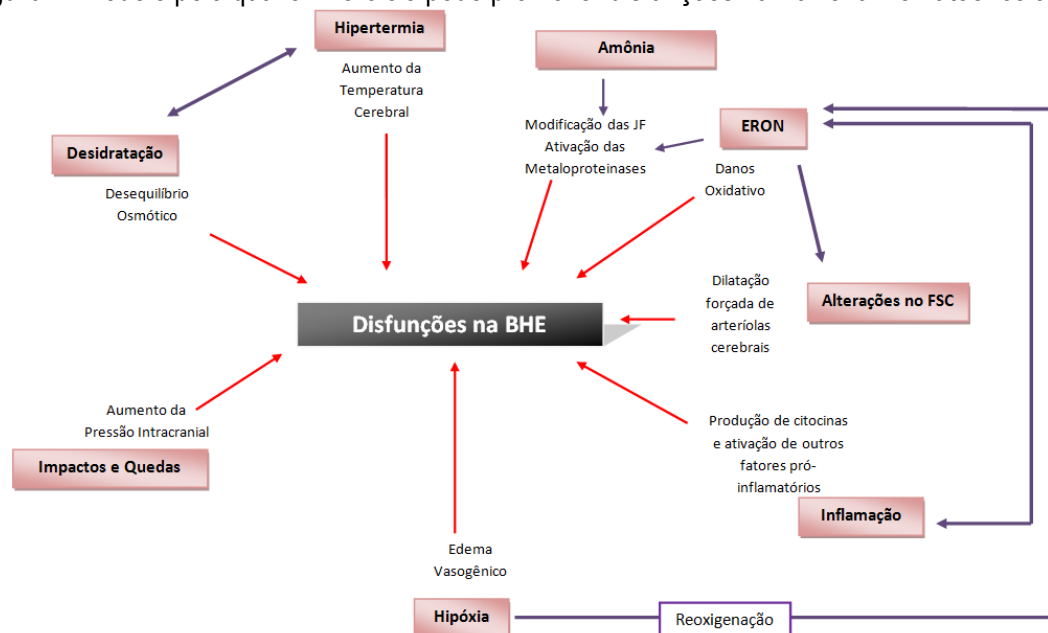
A maior parte das pesquisas que investigaram lesões na BHE induzidas por exercício teve como base o estudo dos impactos – principal fator responsável pelas lesões cerebrais traumáticas (LCT), na possível permeabilidade da barreira. Outras hipóteses que sugerem danos à BHE mediados por exercício são levantadas, porém, é unânime afirmar que os impactos na

cabeça e colisões envolvidas na prática de alguns esportes são capazes de desencadear esse processo.

Dentre as outras respostas fisiológicas ocorrentes durante o exercício, evidências apontam para que o aumento da temperatura corporal em ambientes quentes (Watson *et al.* 2005), alterações da circulação cerebral dinâmica (Bailey *et al.* 2011), e condições de hipóxia durante estado de apneia (Andersson *et al.* 2009), sejam também são capazes de promover aumento da permeabilidade da BHE.

Uma sugestão para um modelo capaz de explicar os mecanismos pelos quais as alterações fisiológicas mediadas pelo exercício são possíveis de causar disfunção da BHE está explicitada na figura a seguir:

Figura 1. Modelo pelo qual o Exercício pode promover disfunções na Barreira Hematoencefálica



BHE: Barreira Hematoencefálica; ERON: Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio; FSC: Fluxo Sanguíneo Cerebral; JF: Junções Fechadas;

As atividades que envolvem impacto na cabeça foram exaustivamente pesquisadas (Mussack *et al.* 2003; Stalnacke e Sojka, 2008; Neselius *et al.* 2012; Graham *et al.* 2011), pois existem sérias evidências que apontam a associação entre traumas na cabeça e doenças neurodegenerativas (McCrory *et al.* 2007), muitas vezes associadas a disfunções causadas na BHE devido a impactos (Archer, 2012). Todavia, pesquisas envolvendo outras atividades – para além do boxe amador (Graham *et al.* 2011) e do boxe profissional (Otto *et al.* 2000), também procuraram encontrar alterações da permeabilidade da BHE em decorrência do exercício, como futebol de campo (Stalnacke *et al.* 2006), corrida (Hasselblatt *et al.* 2004), ciclismo (Schulte *et al.*

2011; Bailey *et al.* 2011), hockey (Stalnacke *et al.* 2003) e natação (Dietrich *et al.* 2003), foram utilizados para verificar os possíveis efeitos destas atividades nos marcadores de lesão cerebral.

A tabela presente no artigo em anexo (Anexo 1), lista os estudos encontrados na literatura que investigaram os efeitos do exercício nos marcadores de lesão na BHE e neuronal.

2.4 Interação entre BHE e síntese de Neurotransmissores – como ocorre este processo?

A síntese de inúmeros neurotransmissores, bem como o funcionamento de uma variedade de fármacos no cérebro, depende do funcionamento adequado da BHE. Esta estrutura é responsável pelo controle de entrada e saída de várias substâncias da corrente sanguínea para o cérebro e, concomitantemente, do sistema nervoso central (SNC) à circulação.

Os neurônios no SNC comunicam usando uma combinação de sinais químicos e elétricos, e a regulação precisa do microambiente iônico local em torno das sinapses e axônios é primordial à sinalização neural (Abbott *et al.* 2010). No que concerne aos neurotransmissores envolvidos na fadiga central, a BHE desempenha um papel chave no controle de alguns precursores, como os aminoácidos triptofano (precursor da serotonina – 5-HT), e tirosina (precursor de dopamina (DA) e noradrenalina).

Conforme mencionado anteriormente, a BHE possui junções fechadas que selam o espaço de difusão para-celular; assim, para atravessá-la, a maioria dos solutos deve ou dissolver-se de maneira difusa em toda a membrana celular das células da barreira, ou serem transportados através de canais transportadores (Smith, 2000). A BHE é ainda composta por duas membranas em série, luminal e abluminal, constituindo membranas do endotélio capilar cerebral, separados por cerca de 300nm de citoplasma endotelial (Pardridge, 1998). Os vários facilitadores de transporte (mecanismo de difusão passiva) são reconhecidos por desempenhar um papel chave na regulação do metabolismo cerebral, através de sua capacidade de limitar o acesso de determinadas substâncias dentro do SNC (Pardridge, 1988). A síntese de neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas, além das monoaminas 5-HT e DA dependem, basicamente, da disponibilidade de entrada de seus precursores no cérebro, que é regulado por alguns canais de transporte na BHE.

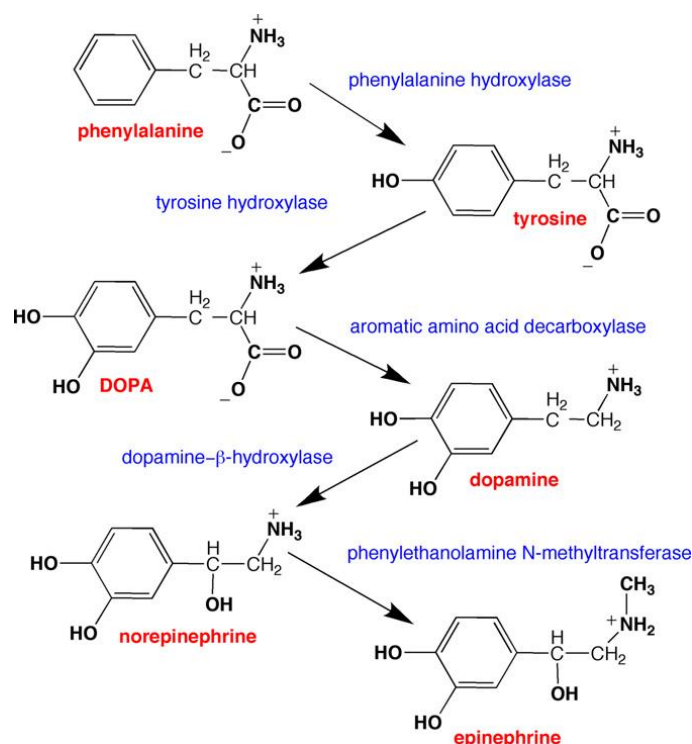
Os canais denominados “L1” são, sem dúvida, a maneira mais importante pela qual os aminoácidos neutros essenciais obtêm acesso ao cérebro (Hawkins *et al.* 2006). A 5-HT, por exemplo, é sintetizada através do aminoácido triptofano (TRP), sendo que este aminoácido compete com os outros aminoácidos neutros (AN) e de cadeia ramificada pela entrada no cérebro, através dos canais L da BHE (Pardridge, 1998). Uma vez que a enzima limitante do processo no sistema nervoso central (triptofano hidroxilase) não está totalmente saturada em

condições normais (Fernstrom, 2005), a taxa de síntese de 5-HT é dependente da disponibilidade do substrato - triptofano livre (Fernstrom, 2012).

No que diz respeito à síntese cerebral de DA, adrenalina e noradrenalina, seus precursores primários são os aminoácidos fenilalanina e tirosina. Ambos estão aptos a atravessar a BHE pelos canais L, que são facilitadores de transporte de aminoácidos essenciais neutros (Hawkins *et al.* 2006). A tirosina hidroxilase (conversora de tirosina em DOPA) é a enzima limitante da biossíntese das catecolaminas no cérebro (Feve, 2012). Todavia, DA, noradrenalina e adrenalina, são todas promotoras de realimentação inibitória da atividade da tirosina hidroxilase (Daubner *et al.* 2011), podendo alterar a taxa de trabalho desta enzima.

A figura presente na próxima página demonstra a biossíntese dos neurotransmissores catecolaminérgicos no cérebro, tendo em conta a disponibilidade dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Pode-se assumir, até certo ponto, que a disponibilidade dos aminoácidos necessários no processo é condicionante para a síntese dessas catecolaminas, porém, não é o único fator responsável.

Figura 2. A Biossíntese das catecolaminas:



O caminho biossintético para os neurotransmissores de catecolamina. A enzima Fenilalanina Hidroxilase converte fenilalanina em tirosina, e Tirosina Hidroxilase hidroxila a tirosina à DOPA. DOPA é convertida em dopamina pela descarboxilase de aminoácido aromático. Dopamina-β-hidroxilase converte dopamina a noradrenalina, que é metilada à adrenalina pela feniletanolamina N-metiltransferase. A Tirosina Hidroxilase é a enzima limitante desse processo. Adaptado de Daubner *et al.* (2011).

Por ser precursora da DA, a manipulação dietética do aminoácido tirosina é entendida como capaz de alterar a capacidade de exercício, pois se especula que aquele neurotransmissor

está diretamente relacionado com a performance, principalmente por atuar na termorregulação (Meeusen e Roelands, 2010), atenuando a deterioração do desempenho mediado pela fadiga central. Todavia, alguns achados na literatura ainda são conflitantes, demonstrando ao mesmo tempo a eficácia (Tumilty *et al.* 2011) e a ineficácia (Watson *et al.* 2012) da suplementação com tirosina na melhoria da capacidade de exercício realizado no calor.

2.5 Fadiga Central – da síntese das Monoaminas e Catecolaminas aos marcadores periféricos

A Fadiga Central durante exercício prolongado pode ser entendida como a diminuição da performance em detrimento de significativas alterações no metabolismo cerebral e neurotransmissão durante a atividade.

Evidências sugerem que, no desenvolvimento da fadiga central, existe o envolvimento do sistema serotoninérgico, catecolaminérgico e dopaminérgico (Meeusen *et al.*, 2006; Roelands e Meeusen, 2010), sendo que estes fatores interagem juntos para a instalação da “lassidão” durante uma atividade prolongada.

O significado do sistema serotoninérgico no comportamento, humor, ansiedade e fadiga, bem como para o estresse e eficiência mental e física, tem sido postulado em numerosas pesquisas e foi avaliado criticamente em várias revisões (Wipfli *et al.*, 2011; Struder e Weicker, 2001; Greenwood e Fleshner, 2011). Ao mesmo tempo, percebeu-se uma importante contribuição das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), bem como da dopamina, e suas relações com outros sistemas no processo de instalação de fadiga (Roelands e Meeusen, 2010). A relação entre a 5-HT e os transtornos mentais também despertam atenção especial na atualidade, através de sofisticadas e atuais revisões envolvendo estudos sobre o seu papel no tratamento da depressão (Porter *et al.* 2004; Deshauer *et al.* 2008; Schueler *et al.* 2011; Zhong *et al.* 2012).

Uma vez que a 5-HT não é capaz de cruzar a BHE, os neurônios são responsáveis por sintetizá-la, por si próprios, no cérebro (Diksic e Young, 2001). A síntese de 5-HT cerebral pode ser modulada por três fatores: quantidade de TRP total no plasma (proporção entre a parcela livre e a ligada à albumina); transporte de TRP livre pela BHE contra seus competidores (TRP/≤AN) e a atividade da enzima triptofano hidroxilase. Os dois primeiros mecanismos possuem possibilidade de manipulação dietética (Rossi e Tirapegui, 2004). Entretanto, apenas uma pequena parcela de TRP livre (~10% do total) consegue atravessar a BHE. Essa porção de triptofano compete com os aminoácidos de cadeia ramificada para entrar no cérebro através dos canais L de transporte (Yamamoto e Newsholme, 2000).

Uma vez no cérebro, esse aminoácido passa por conversões enzimáticas para a síntese de 5-HT, sendo que a produção deste neurotransmissor depende fundamentalmente da disponibilidade de TRP (Maes *et al.*, 2011).

No que diz respeito à associação de 5-HT com a manifestação dos sintomas de fadiga em exercício, muitos trabalhos foram desenvolvidos nas últimas décadas e, até certo ponto, nem todos os resultados convergem para a mesma direção.

Estudos que visaram verificar alguns aspectos da modulação da fadiga central – através da atividade do sistema serotoninérgico, realizados em diferentes configurações metodológicas, utilizaram desde a manipulação de inibidores seletivos de recaptção da serotonina - ISRS (Davis *et al.* 1993), à suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (Watson *et al.* 2004), conforme citado em revisão sobre o assunto (Meeusen *et al.*, 2006).

2.5.1 Exercício Prolongado e Prolactina

A Prolactina (PRL) é um hormônio peptídeo envolvido em mais de 300 ações biológicas diferentes. Sua função biológica compreende diversas categorias, desde a reprodução, manutenção da homeostase, crescimento e desenvolvimento, metabolismo, regulação imune e comportamento (Freeman *et al.* 2000).

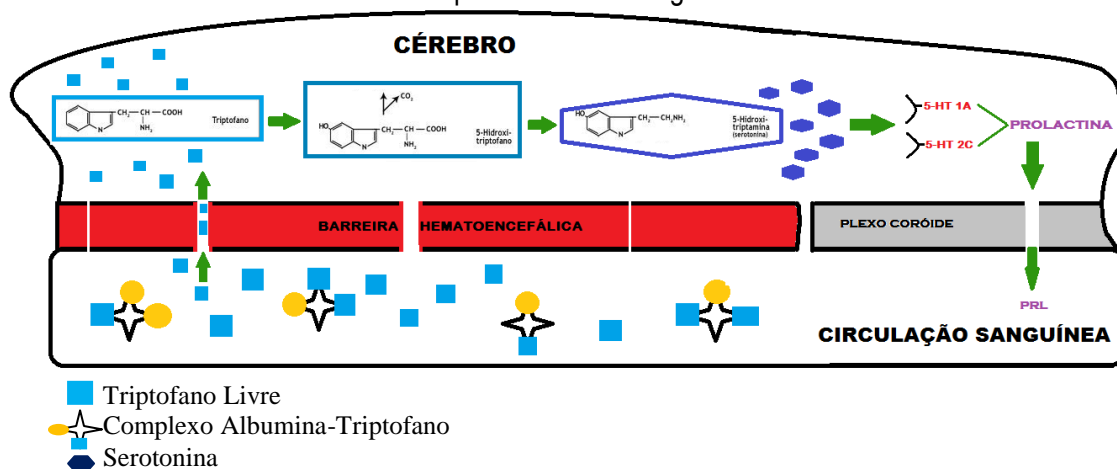
Uma vez que a síntese de serotonina e a atividade serotoninérgica no cérebro não é facilmente mensurada por meios diretos em humanos, alguns parâmetros periféricos são utilizados para refletir o estado da atividade serotoninérgica central (Strüder *et al.* 1999). Dessa forma, um indicador periférico da fadiga central, capaz de representar a atividade de alguns hormônios cerebrais é a prolactina (PRL). Dado que os neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos estimulam e inibem a secreção de PRL, respectivamente (Low *et al.* 2005; Bridge *et al.* 2003), este hormônio pode, assim, ser um importante marcador do balanço existente entre as atividades serotoninérgica e dopaminérgica durante o exercício. O aumento nos níveis de secreção de PRL está associado ao aumento da temperatura central (Pitsiladis *et al.* 2002) e ao aumento dos valores de percepção de esforço durante o atividades realizadas em ambientes quentes (Bridge *et al.* 2003).

Mesmo tendo em conta que a secreção de prolactina pode ser regulada por uma variedade de fatores, existe um certo consenso em afirmar que, durante o exercício, esta secreção é fomentada principalmente pelo estímulo aos receptores serotoninérgicos, o que aumenta a concentração de prolactina no sangue. A elevação da síntese de serotonina central durante exercício prolongado pode ser refletida, então, na quantidade periférica de prolactina (Dietrich *et al.* 2003).

Além disso, estímulos internos e externos que influenciam a liberação de PRL acionam o hipotálamo, afetando neurônios neuroendócrinos que secretam Fatores de Liberação de Prolactina (FLP) e Fatores Inibidores de Prolactina (FIP) (Rojas Vega *et al.* 2012). Os efeitos do exercício sobre PRL são provavelmente mediados pela liberação de FLP, mais do que a atividade dos FIP (Rojas Vega *et al.* 2012).

A ilustração a seguir demonstra um modelo sugestivo pelo qual a síntese de 5-HT pode influenciar a maior liberação de PRL na circulação periférica durante exercício.

Figura 3. Mecanismo sugestivo de liberação da Prolactina mediada pelo estímulo aos Receptores Serotoninérgicos



No que diz respeito aos neurotransmissores envolvidos na inibição e liberação de PRL, as vias dopaminérgicas centrais inibem a liberação PRL e, por outro lado, considera-se que as vias serotoninérgicas centrais são excitatórias (Ben-Jonathan *et al.* 2001). O hipotálamo inibe de forma tônica a secreção de PRL pela adeno hipófise. A dopamina, o principal FIP, é liberada na circulação da porta hipofisária, e atinge os lactotrofos acoplado-se a receptores específicos (D2) que existem em suas membranas (Guyton e Hall, 1996). Os neurônios que produzem os FLP são ativados pela serotonina (5-HT). Os neurônios serotoninérgicos induzem a liberação de prolactina da hipófise anterior pela ativação central dos receptores 5-HT1A e/ou 5-HT2A/C2 (Van de Kar *et al.* 1996). Além disso, GHRH, GnRH, vasopressina, angiotensina II, NPY, galanina e substância P também podem aumentar os níveis de PRL. Todavia, o papel fisiológico de 5-HT na secreção de PRL vem sendo utilizada como um marcador hormonal para a atividade de 5-HT em resposta ao exercício (Strüder e Weicker, 2001).

A prática de diferentes atividades tem sido utilizada para especificar a resposta da PRL ao exercício. De forma concisa, podemos dizer que o exercício anaeróbio (de alta intensidade e

curta duração) e aeróbico (de longa duração) parecem induzir elevações de PRL, considerando que existem poucas evidências sobre as alterações dos níveis de PRL relatadas para o exercício de força (Rojas Vega *et al.* 2012). De fato, após exercícios prolongados – como pedalar durante 30 minutos em intensidade de 70%VO_{2máx}, elevam-se significativamente os níveis de PRL, sugerindo maior atividade do sistema serotoninérgico, comparativamente à realização de exercício resistido onde os valores de PRL permaneceram inalterados (Stokes *et al.* 2012).

Todavia, pesquisas que avaliaram a alteração dos níveis de prolactina em resposta ao exercício ainda são conflitantes, uma vez que alguns resultados demonstraram aumento pós-exercício (Pitsiladis *et al.* 2002; Dietrich *et al.* 2003; Stokes *et al.* 2012) e outros, entretanto, não verificaram diferença em relação ao valor basal desse hormônio (Kiive *et al.* 2004; Karkoulas *et al.* 2008). Essas contradições podem ser explicadas, em parte, pelo fato de que a resposta à prolactina, assim como outros hormônios, é dependente de muitos outros fatores como intensidade, duração, tipo de exercício e nível de treinamento do indivíduo (Stocchero, 2009). Nesse sentido, Rojas Vega *et al.* (2012) apontam que exercícios realizados em baixas intensidades requerem uma duração acima de 60 minutos para induzir um aumento significativo na concentração sérica de prolactina.

Tendo em conta as evidências que demonstram o aumento da captação da TRP-L no cérebro após a realização de exercício prolongado, pode-se especular que durante este tipo de atividade o fornecimento de TRP ao cérebro é um dos condicionantes para a maior liberação de prolactina.

Isso é perfeitamente justificável em função da concorrência existente entre os aminoácidos neutros e de cadeia ramificada pelo transporte através da BHE e, nesse caso, sugere-se que a entrada de alguns deles (como a tirosina e fenilalanina) no cérebro, são capazes de “retardar” a instalação da fadiga central, resultando em aumento da competição contra a passagem de TRP livre para o SNC. Todavia, uma mudança nesses precursores poderia levar ao decréscimo na dopamina e aumento da síntese de serotonina, conseqüentemente aumentando a secreção de PRL (Wright *et al.* 2012).

Sabendo que a liberação de S-100B pode ser também estimulada pela síntese de serotonina (Azmitia 2001), os níveis séricos de prolactina podem ser utilizados como um parâmetro indireto para investigar a interação entre S100B e serotonina (Stocchero, 2009).

2.5.2 As Catecolaminas e o Exercício Prolongado – Noradrenalina, Dopamina e suas Relações com a Fadiga Central

Sabe-se que a instalação da fadiga envolve a interação de fatores centrais e periféricos e, no primeiro caso, o estudo de diferentes neurotransmissores e suas relações com a performance tem sido exaustivamente pesquisado. Já está muito bem estabelecido que a síntese de serotonina desempenha um papel chave na instalação da fadiga central (Strüder e Weicker, 2001; Nybo e Secher, 2004) e, de forma relativamente recente, percebeu-se também o grande envolvimento do sistema catecolaminérgico e dopaminérgico durante o exercício (Hasegawa *et al.* 2008; Foley e Fleshner, 2008), corroborando a ideia de que a fadiga é resultado da interação de diferentes fatores, e não apenas da atividade isolada de um único neurotransmissor (Roelands e Meeusen, 2010).

A hipótese da fadiga central baseia-se no pressuposto de que o exercício prolongado influencia a síntese e metabolismo de monoaminas centrais, nomeadamente serotonina, dopamina e noradrenalina (norepinefrina) (Meeusen *et al.* 2006). A serotonina, neste caso, recebeu um papel de destaque nos estudos que investigaram o fenômeno da fadiga central, uma vez que este neurotransmissor está diretamente relacionado com a modulação das sensações de sonolência, depressão e humor (Maes, 2011; Haenisch e Bönisch, 2011).

Uma limitação para esta hipótese da fadiga central é a suposição de que apenas um neurotransmissor (serotonina - 5-HT), possa influenciar a fadiga isoladamente pois, conforme a revisão de Meeusen *et al.* (2006), a fadiga central é resultado da interação no metabolismo e síntese de vários neurotransmissores, sendo que esta complexidade é melhor exemplificada pela observação de que as drogas que alteram as concentrações de dopamina (Leite *et al.* 2010; Jacobs e Bell, 2004), noradrenalina (Klass *et al.* 2012) e GABA (Abdelmalki *et al.* 1997), também influenciam na fadiga (Foley e Fleshner, 2008).

É concebido também que o desequilíbrio da síntese de 5-HT pode influenciar outros neurotransmissores, como a DA, durante o exercício realizado até à fadiga (Foley e Fleshner, 2008). Pesquisas experimentais com animais e humanos que envolveram o estudo da fadiga, muito bem detalhado em algumas revisões (Meeusen *et al.* 2006; Roelands e Meeusen, 2010) mostram que os níveis de noradrenalina e dopamina aumentam no cérebro durante o exercício, todavia, a manipulação farmacológica desses neurotransmissores nem sempre surtiu o efeito esperado.

Com base em diferentes evidências ao longo das últimas décadas, McMorris *et al.* (2008) sugerem que o aumento das concentrações plasmáticas das catecolaminas adrenalina e noradrenalina, que ocorrem imediatamente antes e durante o exercício devido à ação do sistema

simpatoadrenal, são indicativos do aumento desses neurotransmissores catecolaminérgicos e de DA no cérebro. Uma redução do neurotransmissor DA na substância negra *pars compacta* (SNpc), por exemplo, poderia prejudicar a ativação dos gânglios basais e reduzir a estimulação do córtex motor, levando à fadiga central (Foley e Fleshner, 2008).

Davis e Bailey (1997) apontam que o aumento da atividade serotoninérgica durante uma atividade física pode contribuir para a fadiga através da inibição do sistema dopaminérgico. Partindo deste princípio, os mesmos autores sugerem que uma baixa proporção da relação 5-HT:DA cerebral favorece o desempenho, considerando que uma alta proporção de 5-HT:DA diminui a performance (fadiga central).

É plausível sugerir que o cérebro contribui na fadiga pela alteração do circuito dopaminérgico envolvido no movimento (Foley e Fleshner, 2008), uma vez que a liberação de dopamina do SNpc é necessária para a ativação dos gânglios basais, uma série de neurônios do mesencéfalo responsáveis pela criação do movimento (Chaudhuri e Behan, 2000).

Um dos achados mais consistentes na literatura envolvendo pesquisa com animais foi a observação de que a liberação e o conteúdo de DA é maior durante a atividade física. Bliss e Ailion (1971) foram os primeiros a relatar que ratos submetidos à 1h de natação ou 30 min de corrida demonstraram um aumento de DA no cérebro e ácido homovanílico (um metabólito de DA) em todo cérebro, mensurado imediatamente após o exercício (Foley e Fleshner, 2008).

A determinação de 3metoxi-4hidroxifenil-glicol (MHPG) como um metabólito principal da noradrenalina pode refletir alterações da atividade noradrenérgica condicionada à doença psiquiátrica e a terapia de droga (Reuster *et al.* 2002) e, tendo em mente que este neurotransmissor possui relação com o desempenho de exercício, a determinação de MHPG durante o exercício físico pode ser sugerida como um importante auxiliar periférico para controle do treino e efeito do exercício na fadiga central.

2.6 A determinação salivar de Hormônios envolvidos no Exercício – Cortisol e Deidroepiandrosterona (DHEA)

Ao longo dos anos, a mensuração de hormônios e outros parâmetros fisiológicos têm sido utilizados em ambientes clínicos, objetivando detectar e monitorar o progresso de algumas doenças (Hansen *et al.* 2008). Os aspectos bioquímicos do comportamento têm atraído interesse crescente nos últimos anos e, de uma forma mais prática, dentre os fluidos corporais utilizados para estas verificações, a saliva oferece uma alternativa não-invasiva e livre de stress, diferentemente da coleta sérica (Gatti e De Palo, 2011). A maior parte das vias moleculares afeta o comportamento direta ou indiretamente, mas as moléculas mais influentes são aquelas

reguladoras envolvidas nos sistemas nervosos e hormonais (Shabani *et al.*, 2011). O exercício físico é reconhecidamente uma ferramenta muito importante na modulação dessas moléculas, capazes de alterar significativamente a produção/liberação de alguns hormônios (Stokes *et al.* 2012). Exatamente por estes motivos a saliva tornou-se muito popular no monitoramento fisiológico das áreas da ciência do esporte e do exercício (Papacosta e Nassis, 2011), como pode ser conferido em alguns trabalhos de revisão sobre o assunto (Gatti e De Palo, 2011; Hansen *et al.* 2008).

O esporte de elite é um campo apropriado para estudar a resposta dos esteroides salivares ao stress (Moreira *et al.* 2009), e as diferentes intensidades de exercício, duração e tipo de esforço também devem ser levados em conta (VanBruggen *et al.* 2011). Nesse caso, o cortisol, a testosterona e a deidroepiandrosterona (DHEA) são os hormônios que mais tem sido estudados em relação ao exercício (Gatti e De Palo, 2011).

O cortisol é sintetizado pelo córtex adrenal em resposta à secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula a mobilização da energia que é necessária para superar o estressor (Lennartsson *et al.* 2012) Este hormônio também possui relação com disfunções psicológicas como a depressão (Brown *et al.* 2004), transtorno bipolar (Manenschiijn *et al.* 2012), além da modulação em condições de ansiedade (Draper *et al.* 2012) e outros distúrbios fisiológicos evidenciados em alguns trabalhos.

O exercício físico é capaz de alterar os níveis de cortisol, tanto por mecanismos de estimulação coordenada do sistema simpato-adrenal (Iranmanesh *et al.* 2011), ou por ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical (Krüger *et al.* 2011), sendo que estas alterações estão diretamente relacionadas com a intensidade, duração e tipo de atividade realizada (Stokes *et al.* 2012; VanBruggen *et al.* 2011).

O perfil metabólico de um exercício físico pode ser modulado pelas alterações na liberação de vários hormônios, que muitas vezes interagem durante a atividade para desencadear as respostas fisiológicas necessárias para a manutenção ou cessação do exercício. No que diz respeito ao metabolismo, como mencionado anteriormente, a interação entre cortisol e DHEA desempenha um papel chave na manutenção da atividade. Partindo deste princípio, os níveis salivares de cortisol podem fornecer/contribuir um índice sensível de stress, como demonstrado na relação entre ansiedade cognitiva e somática e cortisol (Filaire *et al.* 2001).

Enquanto o cortisol é um hormônio catabólico, DHEA tem ação anabólica e, dessa forma, possui um papel protetor e regenerativo (Theorell, 2008; Maninger *et al.* 2009; Lennartsson *et al.* 2012). Este é um importante hormônio secretado das glândulas supra-renais,

lançado juntamente com o cortisol em resposta ao ACTH pela glândula pituitária (Reisch *et al.* 2005), que também pode ser apresentado em sua formação sulfatada – DHEA-S. Está muito bem estabelecido que DHEA-S reforça o sistema imune, enquanto, por outro lado, o cortisol que também é produzido pelo córtex adrenal, é imunossupressor quando os níveis estão cronicamente elevados (Buford e Willoughby, 2005). A representação de cortisol em relação ao DHEA, e o conseqüente aumento da proporção cortisol/DHEA evidenciado com envelhecimento (Phillips *et al.* 2007), está associado a deficiências imunitárias e risco de infecção em adultos mais velhos (Butcher *et al.* 2005; Heaney *et al.* 2011). Um papel importante de DHEA é agir como um precursor circulante para a conversão de andrógenos e estrógenos nos tecidos por todo o corpo além de ser um dos principais esteroides neuroativos sintetizados no cérebro (Liu e Papadopoulos, 2005).

Evidências sugerem a atuação de hormônios esteroides no SNC, entre eles a DHEA. Todavia, como a passagem de DHEA pela barreira hematoencefálica não aparenta ocorrer facilmente, propôs-se que o tecido nervoso seria capaz de sintetizar esteroides novamente, ou seja, a partir do colesterol, em parte, independentemente da produção das glândulas periféricas, sendo chamados assim de neuroesteróides (Baulieu e Robel, 1998).

Nesse sentido, ainda não está esclarecido se eventuais lesões na BHE oriundas da prática de exercício são capazes de alterar a síntese deste neuroesteróide e, doravante, esta hipótese necessita ser melhor investigada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar as associações existentes entre lesões na barreira hematoencefálica e marcadores periféricos de fadiga central, induzidas por exercício prolongado.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a influência da prática de diferentes modalidades, com e sem impacto axial, em lesões da barreira hematoencefálica;
- Examinar se lesões na barreira hematoencefálica são condicionantes para aumento da atividade serotoninérgica central;
- Estudar as relações existentes entre cortisol e deidroepiandrosterona durante exercício prolongado.

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Delineamento

Estudo experimental caracterizado pelo mesmo grupo de atletas realizarem dois protocolos distintos de exercício a uma mesma intensidade relativa de esforço.

4.2 População e Amostra

A população estudada foi composta por indivíduos do gênero masculino, praticantes de triatlo. A amostragem foi do tipo intencional (não probalística). Participaram do estudo oito atletas, integrantes da Federação Portuguesa de Triatlo, com idade média de 19,87 anos ($DP \pm 2,29$).

Devido à natureza da pesquisa, foram incluídos no estudo apenas os indivíduos/atletas com consumo de oxigênio máximo acima de $50 \text{ ml.kg.min}^{-1}$, e que encontravam-se em treinamento regular. Como fatores de exclusão foi adotado a presença de lesão músculo-tendínea ocorrida nas últimas semanas anteriores ao estudo, conforme levantamento feito por ocasião da anamnese. O critério para caracterização da lesão foi relato pessoal, e não obrigatoriamente diagnóstico médico prévio.

Foi solicitado aos participantes do estudo que não realizassem treino de corrida/ciclismo nas 24h que antecederem os testes, e que diminuíssem a ingestão de alimentos com alta concentração de triptofano. Apesar de ideal, a abstenção completa de exercícios nos dias anteriores ao teste não pode ser possível, uma vez que a amostra foi constituída de atletas de competição, e os mesmos seguem um cronograma rígido de treinamento. O agendamento dos testes ocorreu de acordo com as possibilidades de horário dos atletas, cuidando-se para que houvesse um intervalo mínimo de um dia entre a realização dos protocolos experimentais.

4.3 Instrumentos de Medida

Os testes máximos do estudo foram realizados no Laboratório de Biocinética, localizado na Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra, e os protocolos experimentais foram conduzidos no Centro de Treinamento do Triatlo, em Montemor-o-Velho.

Os equipamentos para avaliação antropométrica incluíram: uma balança eletrônica SECA (Modelo 770 Hanover – USA), com precisão de 0,1 kg utilizada para determinação da massa corporal; um estadiômetro portátil Harpenden (modelo 98.603 – Reino Unido), e um pletismógrafo BodPod (Composition System - BodPod 2006, EUA).

Para mensuração da potência aeróbia (expressa em $VO_{2máx}$), foi utilizado um analisador de gases Quark CPET (Cosmed – Itália), analisado com software específico em microcomputador. Foram adotados procedimentos de calibração padrão dos equipamentos utilizados no teste, que precederam todos os protocolos de exercício.

Assim que chegaram ao laboratório, os atletas foram informados dos procedimentos e objetivos do estudo, assim como os possíveis desconfortos associados à participação. Em seguida, preencheram um formulário de consentimento para participar da investigação, realizando também as avaliações antropométricas e determinação do percentual de gordura.

4.4 Teste Máximo em Cicloergômetro

Após a chegada do atleta ao laboratório, os mesmos foram informados sobre o protocolo máximo a ser realizado em cicloergômetro (Lode Excalibur – Lode – Holanda). Seguido da pesagem do indivíduo e colocação do monitor cardíaco (Polar – Electro Polar S810, Finlândia), o atleta realizou um teste máximo para mensuração da potência aeróbia ($VO_{2máx}$) e do limiar de lactato.

O teste consistiu na realização de um protocolo sem intervalos, incremental, por patamares de 3 minutos, conduzidos até a exaustão volitiva. A carga inicial foi estipulada em 90W e recebeu incremento de 30W a cada 3 minutos de exercício. Entre os patamares foram retirados coletas de sangue capilar para análise do lactato.

4.5 Teste Máximo em Tapete Rolante

Após a chegada do atleta ao laboratório, os mesmos foram informados sobre o protocolo máximo a ser realizado em tapete rolante (HP Cosmos – Quasar, Alemanha). Seguido da pesagem do indivíduo e colocação do monitor cardíaco, o atleta realizou um teste máximo para mensuração da potência aeróbia ($VO_{2máx}$) e do limiar de lactato.

O teste consistiu na realização de um protocolo de exercício em tapete rolante, com inclinação de 1°, velocidade inicial de 11km/h^{-1} e incremento de 1km/h^{-1} a cada 3 minutos, conduzido até a exaustão. Entre os patamares existiram 30 segundos de intervalo para à retirada de sangue capilar para determinação do lactato e ajuste de velocidade do tapete rolante. Os avaliados receberam instruções sobre o procedimento de coleta de intervalo e saída do tapete rolante.

4.6 Testes Experimentais

Conduzidos no Centro de Treinamento de Triatlo, os protocolos experimentais consistiram da realização de dois exercícios contínuos de longa/média duração (40 minutos), em intensidade constante determinada em 75% do $VO_{2máx}$ (que foi estipulada através de teste máximo), um em ciclismo e outro em corrida. Foi reservado um espaço de um dia entre as duas situações, de maneira a amenizar os efeitos fatigantes de um protocolo de longa duração sobre o outro. Para poder avaliar o tipo de exercício, sem o viés da intensidade e da duração, o presente estudo foi delineado para que ambos os protocolos (corrida e cicloergômetro) fossem realizados na mesma intensidade relativa de esforço. Todos os testes experimentais foram realizados no mesmo período do dia (entre as 15:30h e 18:30h), uma vez que a realização dos exercícios em horários diferentes poderiam interferir nos índices de alguns marcadores.

Os atletas ficaram livres para ingerirem água, sempre que sentissem necessidade durante o protocolo de exercício, exceto nos 10 minutos finais de cada teste.

4.6.1 Teste Experimental - Cicloergômetro

O protocolo de longa/média duração em cicloergômetro foi realizado utilizando-se a própria bicicleta do atleta acoplada a seu próprio ciclo-simulador (rolos), e conduzido em temperatura de 15°C e umidade relativa em 59%.

Após chegada do atleta ao centro de treinamento, o mesmo era informado sobre os procedimentos de coleta, momento onde era colocado o monitor cardíaco para monitoramento da frequência cardíaca durante o protocolo. Em seguida foram feitas as coletas de sangue e saliva para análise dos marcadores bioquímicos pré exercício.

Seguido de um aquecimento realizado em baixa intensidade, durante 10 minutos, foram realizados os últimos ajustes na bicicleta para dar início ao protocolo de exercício. Este constou da realização de 40 minutos, em trabalho constante, conduzido em intensidade de 75% do $VO_{2máx}$. Durante os testes foram observados constantemente os comportamentos da frequência cardíaca (utilizando o monitor Garmin – *Forerunner 305*), e a percepção subjetiva de esforço (Borg, 1998) ao final dos 40 minutos.

Imediatamente ao final do teste, foram realizadas as coletas pós-exercício das amostras de sangue e saliva.

4.6.2 Teste Experimental - Corrida

Para a aplicação do exercício de corrida foi desenvolvido um teste de campo, onde os atletas realizaram o protocolo contínuo em uma pista localizada próximo ao Centro de

Treinamento do Triatlo (Montemor-o-Velho). A pista não possuía aclive ou declive, sendo escolhida por assemelhar-se com o tipo de estrada existente numa competição.

Após a chegada do indivíduo ao local do teste, o mesmo foi informado exatamente sobre os procedimentos enquanto era colocado o monitor cardíaco. Dessa forma, logo a seguir a um leve aquecimento de corrida por 10 minutos, o atleta estava pronto para o teste experimental. O exercício foi realizado na mesma intensidade relativa do teste anterior (em cicloergômetro), fundamentado na execução do protocolo de 40 minutos em 75% do $VO_{2máx}$. Sabendo a intensidade de trabalho que deveriam manter durante o exercício, a monitoração da frequência cardíaca, velocidade e distância percorridas foram feitas com a utilização do monitor cardíaco Garmin (*Forerunner 305*) dotado de GPS.

As condições climáticas no dia do ensaio (entre 15:30h e 18:30h) constaram de temperatura de 14°C e umidade relativa do ar em 59%.

Os procedimentos de coleta das amostras bioquímicas foram os mesmos realizados no teste experimental em cicloergômetro, constando de coletas de saliva e sangue, antes e imediatamente após o exercício.

4.7 Coletas de Sangue e Saliva

As coletas de sangue e saliva foram realizadas em dois momentos: antes do exercício (em repouso) e imediatamente após a realização do protocolo. Os avaliados receberam instruções sobre o procedimento e assentamento na cadeira para retirada das amostras de sangue e saliva.

O sangue foi coletado por profissional habilitado, seguindo-se todos os cuidados de higiene e assepsia. Foram retirados 12 ml de sangue em dois momentos, com seringa esterilizada, e depositadas em tubos contendo EDTA e tubo para soro:

1º momento: sentado, após um repouso de 15 minutos;

2º momento: sentado, logo após o término do protocolo de exercício.

Para a coleta de saliva realizada a seguir, os atletas foram informados dos procedimentos e permaneceram sentados, com a cabeça inclinada à frente, sendo a saliva (não estimulada) colhida em tubos secos e congeladas até a análise a -20°C.

4.8 Equipamentos para preparação das amostras bioquímicas

Foram determinados os níveis de Prolactina, S100B, Cortisol e DHEA. O material utilizado constou de: centrífuga de mesa modelo Heraeus (Labofuge, 400r), balança analítica (Kern 770-13) para pesagem da saliva, agitador Vórtex, leitor de ELISA modelo ELX800 (Bio-

tek), lavador de placas Hidroflex (Tecan). Foi utilizado também um sistema de destilação e purificação de água modelo Purelab (Option 57-Elga) e Sartorius (Arius), respectivamente, além de um agitador Lab Rotator (modelo DSR – Digisystem Lab Instruments).

4.9 Procedimentos para Análise das Amostras

4.9.1 Prolactina

Prolactina: marcador da atividade serotoninérgica foi determinado utilizando-se o kit comercialmente disponível Human Prolactin ELISA kit (*MyBioSource, Holanda*), sendo os procedimentos divididos em oito etapas conforme o manual de instruções do fabricante. Primeiramente, as amostras de sangue foram centrifugadas durante 15min a 3000rpm para separação do soro. 50µl de *standards* e amostras (soro) para análise foram adicionadas em duplicado nos poços da microplaca. Em seguida foram adicionados 100µl de solução conjugada em cada poço, sendo após encoberto e incubado por 60 minutos. Após preparo dos reagentes, a microplaca foi lavada (5x) usando água destilada. Seguida a lavagem, foi adicionado 100µl de solução de substrato em cada poço, sendo incubado por mais 15 minutos a 37°C. Após adição de 50µl de solução de paragem nas amostras, a leitura de densidade ótica foi feita a 450nm, com sensibilidade mínima estimada em 1,5ng/ml.

4.9.2 S100B

Marcador periférico de lesão na barreira hematoencefálica, foi determinado através do método ELISA, utilizando-se um kit Human S100B ELISA (Biovendor, República Tcheca). Para determinação quantitativa da S100B em soro, foram seguidas as orientações presentes no manual do fabricante. Primeiramente, o soro necessitou ser descongelado e após, 100µl de *standards*, controle e amostras, diluídas (4x) foram adicionadas aos poços da microplaca, em duplicado. Em seguida foi incubado a temperatura ambiente, durante 120 minutos sobre a rotação orbital de 300 rpm. Após preparo de solução e lavagem (3x), foi adicionado anticorpo de solução com anticorpo de biotina (100µl), e incubado por mais 60 minutos a 300 rpm. Em seguida a lavagem (5x) foi adicionado 100µl de estreptavidina-HRP conjugado e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos (300 rpm). Antes da adição da solução com substrato (100µl), foi feita a última lavagem nas placas (5x). A seguir a incubação por 15 minutos, a reação enzimática foi parada pela adição de 100µl de solução de paragem, e o resultado de absorbância foi medido a 450nm.

4.9.3 Cortisol

O Cortisol foi coletado através da saliva, sendo utilizado para verificação dos níveis bioquímicos de stress antes e após o protocolo de exercício. Este marcador foi analisado utilizando-se um kit comercialmente disponível (Salivary Cortisol, Salimetrics, UK). Foram seguidas as instruções presentes no manual do fabricante, que brevemente pode ser descrita como um sistema de imunoensaio, com coeficiente de variação de 3,75%. No dia da análise a saliva foi descongelada, pesada, e centrifugada a $1.500 \times g$ (~3000 rpm) por 15 minutos, permanecendo em seguida em temperatura ambiente. Após isso, 25 μ l de *standards*, controle e amostras de saliva foram adicionadas aos poços da microplaca revestidas com anticorpos monoclonais para cortisol, sendo avaliadas em duplicado. Foram pipetados também 25 μ l de diluente em dois poços que serviram para denominação do valor “zero”, e 25 μ l de diluente em cada poço NSB (poços não revestidos com anticorpo). Após, foi preparada a diluição final do conjugado com *horseradish peroxidase*, misturado, e imediatamente pipetado 200 μ l dentro de cada poço. A placa foi depois incubada por 55 minutos com constante agitação a 500 rpm, em temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi aspirada e lavada quatro vezes para remover todas as substâncias não acopladas. Em seguida, foi adicionado uma solução de 200 μ l de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), e incubado no agitador de placa por 5 minutos a 500 rpm. Mais 25 minutos de incubação em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, foram necessários. Finalmente, a reação enzimática é parada pela adição de 50 μ l solução de paragem, e misturado por mais três minutos em 500 rpm, sendo a absorbância medida a 450 nm.

4.9.4 Deidroepiandrosterona (DHEA)

Este marcador foi analisado utilizando-se um kit comercialmente disponível (Salivary DHEA, Salimetrics, UK). Os métodos de análise constaram de um imuno ensaio, e foi seguido através da descrição presente no kit. Resumidamente, este ensaio constou de descongelamento da amostra de saliva seguida de pesagem, sendo centrifugada em seguida a $1.500 \times g$ (~3000 rpm) por 15 minutos. Após as amostras permanecerem em temperatura ambiente, 50 μ l de *standards*, controle e amostras de saliva foram adicionadas aos poços da microplaca revestidas com anticorpos policlonais anti-DHEA, sendo avaliadas em duplicado. Foram pipetados também 50 μ l de diluente em dois poços que serviram para denominação do valor “zero”, e 50 μ l de diluente em cada poço NSB. Em seguida, foi preparado a diluição conjugada (12 μ l em 18 μ l de diluente de análise), sendo misturado e imediatamente pipetado 150 μ l em cada poço da microplaca. Sendo a placa coberta por uma película adesiva e misturada por 5 minutos (a 500rpm), foi incubada em temperatura ambiente durante 3 horas. Após lavagem da placa (4x)

foram adicionados 200µl de solução de tetrametilbenzidina (TMB) em cada um dos poços, e misturado durante cinco minutos a 500rpm sendo incubado, em seguida, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 25 minutos adicionais. Uma solução de paragem de 50µl foi então adicionada em cada amostra, e misturada por 3 minutos em mesma rotação. A leitura foi feita em absorbância medida a 450nm.

4.10 Cálculo das Concentrações nas Amostras

Para calcular as concentrações através dos resultados obtidos da leitura feita por densidade ótica, foram seguidas as referências presentes no manual de instruções dos fabricantes. Todas as análises possuíram suas particularidades, porém, foi consensual a construção gráfica e equacional dos resultados utilizando-se a absorbância obtida após a leitura (eixo Y) em conjunto com as concentrações conhecidas dos *standards* (eixo X). A concentração da amostra foi feita por interpolação do resultado de densidade ótica sobre o valor de "X" gerado na equação gráfica.

4.11 Procedimento Estatístico para Aquisição dos Dados

Primeiramente, todas as informações coletadas foram armazenadas em um banco de dados para análise. Esta foi feita utilizando-se o software SPSS (*Statistics Package for Social Science, IBM – Versão 20*), para aquisição da significância estatística do estudo. Para comparar as diferenças para cada marcador, antes e após os protocolos, foi usado um teste não-paramétrico Wilcoxon.

Uma correlação bivariada não paramétrica foi conduzida para análise, com o objetivo de verificar possíveis correlações entre os valores de Prolactina e S100B, antes e após exercício, nas duas condições.

Foi considerado estatisticamente significativo os valores de significância menores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

A seguir são apresentados os resultados com as características antropométricas da amostra do estudo e de algumas variáveis fisiológicas, e em seguida, verificam-se os resultados da percepção subjetiva de esforço nas duas modalidades, além das análises bioquímicas obtidas antes e após os protocolos experimentais.

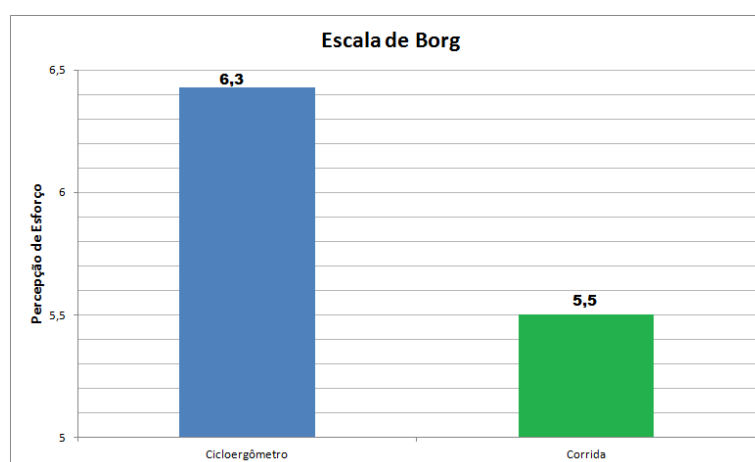
Tabela 1. Caracterização da Amostra do Estudo

n= 8	Média±DP
Idade (anos)	19,87±2,29
Estatuta (cm)	178,43±5,69
Massa Corporal (Kg)	66,7±6,0
IMC (kg.m ⁻²)	20,99±1,25
Gordura Corporal (%)	10,28±4,30
VO ₂ máx – cicloergômetro (ml.kg.min ⁻¹)	60,82±3,75
VO ₂ máx – tapete rolante (ml.kg.min ⁻¹)	59,62±6,35

5.1 Percepção Subjetiva do Esforço após o Exercício

Apesar do fato de que o exercício em cicloergômetro promoveu maior pontuação por parte dos atletas à escala de Borg, sinalizando que houve uma sensação de esforço maior ao final dessa atividade comparativamente ao protocolo de corrida, esta diferença não foi significativa. Os valores médios obtidos na escala encontram-se representados no gráfico abaixo:

Gráfico 1. Percepção Subjetiva de Esforço (Escala de Borg)



5.2 Resultados dos marcadores bioquímicos

Na tabela 2, abaixo, podem ser conferidos os valores médios obtidos nos quatro momentos

Tabela 2.0. Efeito do Exercício sobre as variáveis bioquímicas de Cortisol e DHEA

	Cicloergômetro		Corrida	
	Basal	Pós	Basal	Pós
Cortisol (µg/Dl)	0,346±0,19	0,467±0,10	0,451±0,23	0,450±0,15
		Z = -1,540 p = 0,123		Z = 0,000 p = 1,000
DHEA (pg/ml)	333,78±89,89	511,85±133,64**	357,47±83,36	465,42±83,82*
		Z = -2,521 p = 0,012		Z = -2,240 p = 0,025

Valores apresentados em Média±Desvio Padrão

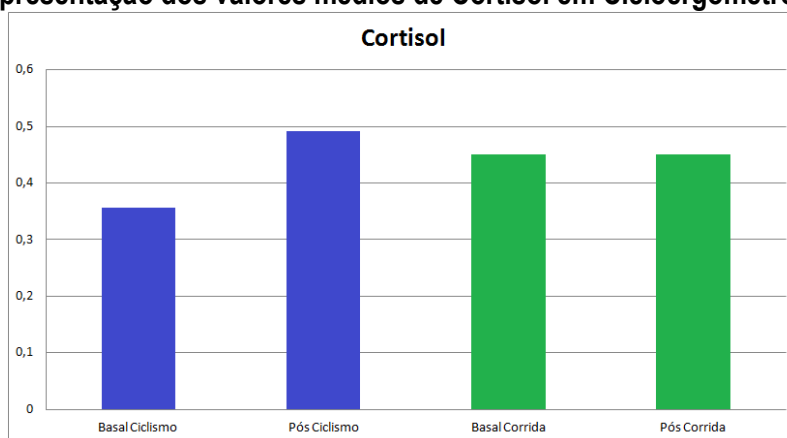
* diferença significativa relativamente ao nível basal

** diferença muito significativa relativamente aos valores basais

p < 0,05

Para os níveis de cortisol, houve um aumento nos valores médios após o exercício de cicloergômetro, mas essa elevação não foi significativa comparativamente ao nível basal (p=0,123). Interessante notar que não foi observado nenhum aumento do cortisol após a execução do protocolo de corrida (p=1,000). Apesar dos valores basais (pré-exercício) no dia da corrida estarem superiores ao valor basal obtido para cicloergômetro, esta diferença não foi significativa (p=0,123). Os valores obtidos após a realização do protocolo em cicloergômetro foram semelhantes aos valores basais encontrados para corrida (p=1,000). Da mesma forma, nos momentos pós teste para ambos protocolos (cicloergômetro e corrida), não foi observada diferença expressiva (p=0,779), mostrando semelhanças nos valores após exercício.

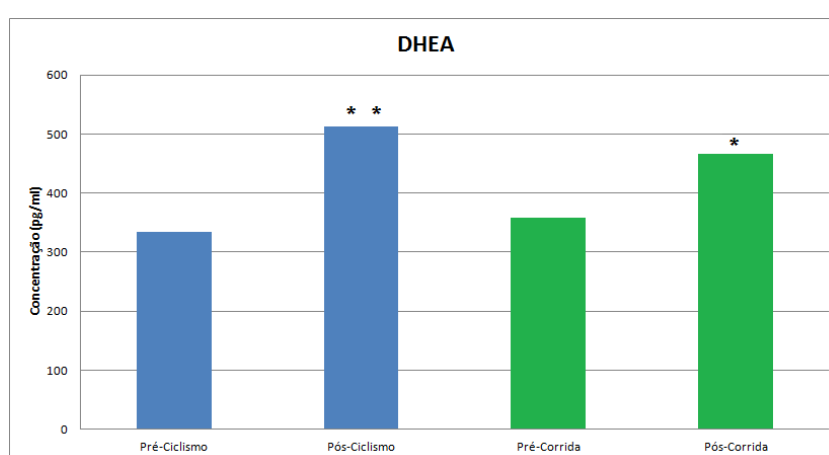
Gráfico 2. Representação dos valores médios de Cortisol em Cicloergômetro e Corrida



(p=0,05)

Verificando os níveis de DHEA, observou-se que existiu diferença significativa entre os valores médios obtidos antes e após teste, constatando uma elevação deste marcador tanto em exercício no cicloergômetro ($p=0,012$), quanto para corrida ($p=0,025$). Os valores pré-exercício (basais) em ambas as condições (cicloergômetro e corrida) foram semelhantes, não sendo encontradas diferenças expressivas ($p=0,263$). O mesmo pode ser dito em comparação aos níveis obtidos pós-exercício, pois não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de DHEA verificados após ciclismo e corrida ($p=0,263$).

Gráfico 3. Representação dos valores médios de DHEA em Cicloergômetro e Corrida



* diferença significativa em relação ao repouso
 ** diferença muito significativa em relação ao repouso
 ($p < 0,05$)

Tabela 3. Efeito do Exercício sobre os níveis de S-100B e Prolactina

	Cicloergômetro		Corrida	
	Basal	Pós	Basal	Pós
S-100B ($\mu\text{g/L}$)	$0,0459 \pm 0,027$	$0,0553 \pm 0,026$	$0,068 \pm 0,15^\#$	$0,0673 \pm 0,020$
		$Z = -1,680$ $p = 0,093$		$Z = -0,420$ $p = 0,674$
Prolactina (ng/ml)	$10,79 \pm 2,63$	$13,12 \pm 4,89$	$9,64 \pm 2,79$	$14,70 \pm 4,94^{**}$
		$Z = -1,540$ $p = 0,123$		$Z = -2,521$ $p = 0,012$

Valores apresentados em Média \pm Desvio Padrão

diferente do estado basal em cicloergômetro ($p=0,036$)

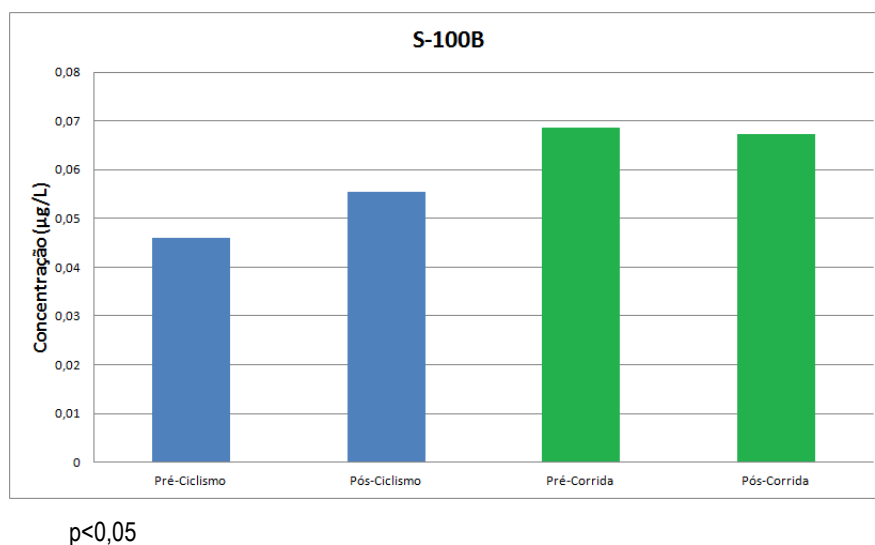
** diferença muito significativa relativamente ao nível basal

$p < 0,05$

Apesar de não serem significativos, os valores da proteína S100B elevaram-se com a execução do protocolo em cicloergômetro ($p=0,093$) diferentemente com o ocorrido após protocolo de corrida, em que (mesmo sem significância expressiva) houve um decréscimo da concentração média deste mesmo marcador ($p=0,674$). Existiram diferenças significativas para

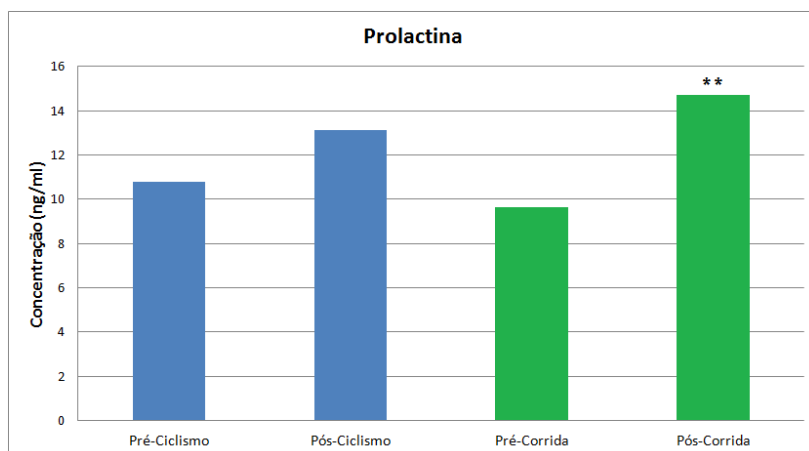
os níveis médios de S100B nas duas situações basais (pré-exercício), sendo que os valores de repouso no teste em corrida estavam mais elevados em comparação ao mesmo momento do ciclismo ($p=0,036$). Além disso, foi observado uma diferença expressiva nos valores pós-exercício entre as dois protocolos, sendo que os níveis médios de S100B após ciclismo foram superiores dos valores encontrados após corrida ($p=0,025$).

Gráfico 4. Representação dos valores médios (basais e pós-exercício) de S100B em cicloergômetro e corrida



Relativamente ao marcador de atividade serotoninérgica central, os valores encontrados após exercícios foram superiores aos níveis basais nas duas modalidades, todavia, apenas o protocolo de corrida aumentou significativamente os níveis de prolactina ($p=0,012$). Apesar de superior relativamente ao repouso, os valores para este mesmo marcador não foram expressivamente diferentes após exercício de ciclismo ($p=0,123$). Os níveis basais de prolactina não apresentaram diferenças entre as duas condições - ciclismo e corrida ($p=0,093$) e, da mesma forma, não foram encontradas diferenças expressivas nesse marcador nos valores pós-exercício entre as duas condições ($p=0,327$), mostrando nesse caso que o nível médio de prolactina após corrida foi semelhante dos níveis encontrados após protocolo em cicloergômetro, conforme pode ser inferido no gráfico 5.

Gráfico 5. Representação dos valores médios (basais e pós-exercício) de Prolactina em cicloergômetro e corrida



** diferença muito significativa em relação ao repouso
 $p < 0,05$

6. DISCUSSÃO

Os objetivos desta pesquisa foram verificar, primeiramente, as associações existentes entre lesões na BHE e marcadores periféricos de fadiga central, induzidas por exercício prolongado. Ao mesmo tempo, analisar se existem diferenças nas lesões da BHE mediante a prática de diferentes modalidades (com e sem impacto axial), e se estes exercícios elevaram significativamente os marcadores de stress e atividade serotoninérgica cerebral.

É importante ter em mente que os indivíduos que fizeram parte da amostra deste trabalho são atletas federados, de nível competitivo, com características morfológicas e fisiológicas semelhantes aos estudos anteriormente realizados com triatletas (Stocchero *et al.* 2010; Neubauer *et al.* 2008). Todavia, os valores do consumo máximo de oxigênio dos indivíduos de nossa pesquisa encontram-se abaixo de outro estudo realizado com triatletas (Millet *et al.* 2003).

Com o objetivo de analisar os efeitos de diferentes tipos de exercício e, com o cuidado para buscar adequada semelhança metabólica entre as duas modalidades, os indivíduos foram submetidos a dois protocolos contínuos de longa duração (40 minutos) realizados em mesma intensidade relativa de esforço determinada em 75% do $VO_{2máx}$ de cada teste máximo específico, um em bicicleta e outro em corrida. Pode-se dizer que a equivalência de esforço entre os dois protocolos foi alcançado, uma vez que a percepção subjetiva mensurada através da escala de Borg (1998), apresentou valores semelhantes nas duas condições (Gráfico 1). Os valores obtidos nos testes máximos para verificação do $VO_{2máx}$ são, obviamente, diferentes, uma vez que o exercício de corrida – em função da massa muscular envolvida na atividade – gera resultados diferentes de um exercício realizado em cicloergômetro. Mesmo assim, tendo em conta a linearidade presente entre os valores de $VO_{2máx}$ e Frequência Cardíaca, a intensidade de esforço estipulada para o teste experimental foi mantida pela utilização de monitores cardíacos por parte dos atletas, sendo que todos os indivíduos realizaram o protocolo em intensidade de 75% do consumo máximo de oxigênio, o que encontra-se abaixo do limiar anaeróbio dos próprios atletas (zona 3 de treinamento).

No que diz respeito aos valores encontrados para cortisol, não foram notadas diferenças entre os valores pós exercício entre os protocolos conduzidos em cicloergômetro comparado à bicicleta. Todavia, apesar de não ser significativa, foi encontrado um aumento no nível de cortisol após exercício em cicloergômetro. Porém, interessante, essa elevação não ocorreu após o exercício de corrida. De fato, é bom ter em mente que, apesar de ideal, a abstenção completa de treinamento entre os protocolos por parte dos atletas não foi possível, uma vez que todos seguem um calendário rígido de treino. Nesse sentido, os elevados valores basais presentes

antes do exercício de corrida podem ter sido influenciados, até certo ponto, pelo treinamento que precedeu a aplicação do protocolo, e especula-se que estes valores elevados encontrados em nossos atletas antes do exercício de corrida tenham amenizado o aumento expressivo após a realização do teste. Comparativamente aos níveis basais, os níveis médios de cortisol salivar não tiveram elevação. Isso é perfeitamente aceitável, uma vez que a intensidade de exercício estipulada para nosso protocolo encontrava-se abaixo do limiar anaeróbio dos atletas e, segundo Viru e Viru (2001), quando a intensidade do exercício é próxima ao limiar anaeróbio (ou um pouco mais baixa), a concentração de cortisol pode sofrer um decréscimo comparado aos valores basais a partir de 30 minutos de exercício, em associação à falta de estimulação corticotrófica (os níveis de corticotrofina são próximas dos níveis basais nesse momento). Vale lembrar que, em todas as situações experimentais, os testes foram realizados no mesmo período do dia, o que ameniza as chances de resultados diferentes devido ao ritmo circadiano, tão influente para os níveis de cortisol (Thorsley *et al.* 2012). A elevação dos valores salivares obtidos foi semelhante com estudo anteriormente realizado (VanBruggen *et al.* 2011) que comparou as alterações deste hormônio após sessão de exercício realizada em três diferentes intensidades. Apesar do valor pós exercício (realizado em cicloergômetro) elevar-se, esta diferença não foi significativa em relação aos níveis basais, situação semelhante a nossos resultados. Nesse sentido, Bloom *et al.* (1976) e Viru *et al.* (2007) relataram que pessoas que são altamente treinadas tendem a ter um limiar de intensidade um pouco maior para provocar aumentos significativos no cortisol. De fato, VanBruggen *et al.* (2011) perceberam elevação significativa dos valores salivares de cortisol apenas após exercício realizado em alta intensidade (85% do $VO_{2máx}$) em cicloergômetro, corroborando com outros trabalhos (Hill *et al.* 2008). Em contrapartida, um protocolo de 60 minutos a 75% do $VO_{2máx}$ elevou significativamente os níveis salivares de cortisol comparados ao repouso (Usui *et al.* 2011), demonstrando também que exercícios realizados em intensidades menores são possíveis de elevar (transitoriamente) os valores desse hormônio. Em nosso trabalho, o leve aumento em relação ao repouso dos valores pós-exercício observado em cicloergômetro podem ser comparados com outros estudos.

Para nosso conhecimento, existem poucas pesquisas que envolveram a mensuração dos níveis de DHEA relacionados à prática de um protocolo de média/longa duração, contínuo, com atletas. Confirmando os resultados de nosso estudo, Heaney *et al.* (2011) verificaram que o exercício agudo é capaz de elevar os valores de DHEA, e que esta elevação pode diferir respectivamente ao gênero masculino ou feminino. Além disso, Riechman *et al.* (2004) verificaram que o exercício é capaz de aumentar de forma aguda este hormônio, porém, o

protocolo utilizado bem como a amostra do estudo é diferente da realidade que tivemos em nossa pesquisa.

Respectivamente ao marcador de lesão na BHE e, diferentemente de estudos anteriores que investigaram esses efeitos em corrida (Otto *et al.* 2000; Stocchero *et al.* 2010), nossa hipótese de que o exercício que envolve impacto axial fosse causar maior lesão na BHE comparativamente à exercício sem impacto não foi confirmada. Os valores detectados em nossos atletas em condições de repouso encontram-se dentro dos níveis normais (Anderson *et al.* 2001). Os valores médios de S-100B apresentados após o exercício em corrida foi semelhantes ao encontrado após ciclismo, e não refletiu o fator do impacto contra o solo como possível causador de maior permeabilidade na BHE. Em primeiro lugar, deve-se ter em mente que o protocolo em cicloergômetro do nosso estudo foi conduzido em condições laboratoriais, bem como a encontrada em outros trabalhos (Stocchero *et al.* 2010; Watson *et al.* 2005). No estudo de Watson *et al.* (2005) os níveis séricos de S100B foram significativamente superiores apenas nos ensaios conduzidos em ambiente quente, o que não ocorreu em nosso protocolo. Ao mesmo tempo, 40 minutos em cicloergômetro realizados em intensidade de 2º limiar ventilatório não elevaram significativamente os níveis de S100B (Stocchero *et al.* 2010).

A pequena (porém insignificante) elevação encontrada nos valores médios de S100B após a realização de nosso teste em ciclismo pode ser explicada por diferentes fatores, porém, é difícil definir quais foram as variáveis envolvidas para esse leve aumento, uma vez que não tivemos controle de todas as variantes capazes de promover danos à BHE durante exercício (conforme Figura 1). Partindo do princípio que vibrações ou impactos leves pudessem causar danos estruturais à BHE, Schulte *et al.* (2011) aplicaram vibração (ao nível das pernas) durante exercício de ciclismo, com duração aproximada de 25 minutos. Da mesma forma, como resultado, não foram encontradas diferenças significativas nos valores de S100B após o exercício.

Em função destes achados na literatura, interpretamos que uma elevação dos níveis de S100B oriundos nos esportes que envolvem contato, está mais associada a eventos de impactos diretos na cabeça (como o caso do boxe) de que outros fatores.

No que concerne ao protocolo de corrida, nossos resultados divergem da maior parte dos estudos anteriormente realizados (ver tabela em artigo Anexo), uma vez que não existiram diferenças entre os valores basais e pós-corrída. Para nossa surpresa, os valores médios de S100B detectados após 40 minutos de corrida não foram superiores aos valores basais, mostrando que a intensidade e duração em nosso exercício não foram capazes de causar lesões na BHE. Otto *et al.* (2000) sugerem que podem ocorrer danos a BHE em função de uma corrida,

provavelmente mediado pelos impactos causados pelos passos. O estudo desse mesmo autor realizou um protocolo de corrida com distância percorrida semelhante à nossa pesquisa (~10.000m), porém, em intensidade diferente (*jogging*). Contudo, deve-se ter em mente que o nível de condicionamento dos indivíduos participantes daquela pesquisa (que é diferente da nossa) e o tempo de exercício (entre 55 e 75 minutos) possam ter influenciado estas diferenças. Interessante notar que aquele estudo promoveu aumento significativo nos níveis de S100B, comparativamente ao repouso, tendo o mesmo ocorrido também após corrida de 25 km.

Todavia, como o exercício de corrida pode ser entendido como um esforço muscular caracterizado por contrações de alongamento-encurtamento, alguns autores propõe que, em função da alta correlação apresentada entre creatina quinase (reconhecidamente marcador de lesão muscular) e S100B, o aumento de S100B após corrida pode ser originado de fontes não cerebrais (Hasselblatt *et al*, 2004). De fato, Stocchero *et al*. (2010) também verificaram que o exercício de corrida – que é mais susceptível a causar lesão muscular do que ciclismo – promoveu um aumento nos níveis séricos de S100B, existindo uma significativa correlação entre esse marcador e a mioglobina, que também é sugerida como indicador de lesão muscular. Nesse sentido, Hasselblatt *et al*. (2004) sugerem que a determinação de creatina quinase pode melhorar a especificidade da S100B como um marcador de dano no tecido cerebral durante um trauma agudo de leve impacto – como é o caso da corrida. Porém, Pham *et al*. (2010) apontam que as fontes extracraniais de S100B não afetam os níveis sanguíneos, de maneira que uma elevação significativa desta proteína em condições séricas reflete, até certo ponto, a influência sobre o dano neuronal – ou, como é o caso específico, na BHE.

É importante ter em mente que o protocolo de corrida de nosso estudo foi totalmente conduzido em terreno e, o que é diferente do ambiente laboratorial. O efeito da termorregulação oriunda do deslocamento do corpo durante a corrida é um importante fator para o controle da temperatura corporal e, de alguma maneira, isso pode ter influenciado nossos resultados. Mesmo sabendo que existem pesquisas que utilizaram corridas de rua como maratona (Hasselblatt *et al*, 2004) e 25km (Otto *et al*. 2000), os indivíduos possuíam características fisiológicas e de treino muito diferentes dos atletas de nosso trabalho e, nesse sentido, ainda são necessários estudos sistemáticos pra confirmar ou negar a influência da termorregulação em lesões na BHE.

Tendo em conta outra hipótese que sugerimos no início de nosso trabalho, era esperado que as lesões na BHE pudessem ser condicionantes para o aumento da atividade serotoninérgica o que, conseqüentemente, viria a aumentar a secreção de prolactina. Porém, até o momento, essa condição não pode ser confirmada.

Dietrich *et al.* (2003) sugerem que o estímulo aos receptores serotoninérgicos, desencadeado pelo aumento da síntese de 5-HT durante exercício prolongado, podem contribuir na liberação de S100B pelos astrócitos, elevando os níveis desta proteína no sangue. Entretanto, da mesma forma que o estudo acima citado, não foi possível fazer essa verificação em nosso trabalho, uma vez que o marcador de atividade serotoninérgica utilizado (prolactina) não esteve correlacionado com os índices de S100B encontrados após exercício de ciclismo e corrida (respectivamente: $p=0,651$ e $p=0,823$). Isso diverge do estudo de Stocchero (2010), onde foi encontrada correlação entre prolactina e S100B após exercício de ciclismo.

Os valores para PRL em nosso trabalho foram maiores após o exercício de corrida do que protocolo de ciclismo, porém, não existiram correlações destes índices com os valores obtidos para S100B.

As concentrações encontradas para a prolactina em nosso estudo são similares a outros (Stocchero, 2009; Dietrich *et al.* 2003). Verificamos um aumento expressivo nos índices de prolactina após o protocolo de corrida ($p=0,012$), denotando uma elevação significativa da atividade do sistema serotoninérgico durante este exercício. Em alguns casos, o aumento nos níveis de secreção de PRL está associado ao aumento da temperatura central (Pitsiladis *et al.* 2002) bem como ao aumento dos valores de percepção de esforço durante exercícios realizados em ambientes quentes (Bridge *et al.* 2003). Apesar de não termos monitorado a temperatura central de nossos atletas durante o exercício prolongado, assumimos que não existiu variação significativa a ponto de influenciar expressivamente os índices de PRL. No nosso caso, o ensaio de ciclismo foi realizado em condições laboratoriais, e a temperatura ambiente não apresentou alterações durante todo o procedimento. Entretanto, o teste de corrida consistiu em um percurso feito com deslocamento ao ar livre, sendo que o efeito da termorregulação é um fator a ter em conta quando comparamos estudos que analisaram corrida sobre tapete rolante (em ambiente laboratorial). Pesquisas realizadas com corrida em laboratório mostraram elevação nos níveis de prolactina (Stocchero, 2009; Hackney e Dobridge, 2009) enquanto outros não apresentaram elevação deste hormônio após corrida (Kraemer *et al.* 1993). Apesar de uma leve diferença na percepção subjetiva de esforço (mais acentuada no protocolo de cicloergômetro), não foi significativamente diferente do teste de corrida, corroborando com a ideia de que a mesma intensidade relativa foi alcançada nas duas condições. Isso seria pouco provável de ocorrer com elevação significativa da temperatura central, uma vez que a realização de exercícios em ambientes quentes promove maior pontuação na escala de Borg (Pitsiladis *et al.* 2002), indicando maior esforço para a realização da mesma atividade, comparativamente de quando o exercício é realizado em temperaturas normalizadas.

Tendo em consideração que a síntese da serotonina pode ser modulada pela ingestão dietética (Rossi e Tirapegui, 2004) e que um aumento dos índices de serotonina cerebral pode refletir maior secreção de PRL, é possível admitir que alimentos ricos em triptofano (precursor de 5-HT) poderiam vir a influenciar os índices de prolactina (Strüder *et al.* 1997). Em humanos saudáveis, a administração de L-triptofano produziu um aumento nas concentrações plasmáticas de prolactina (Price *et al.* 1991) e, considerando isso, os atletas foram orientados à diminuir a ingestão de alimentos ricos em triptofano nas 24h que antecederam cada teste, afim de amenizar os efeitos da ingestão dietética nos índices de prolactina.

O protocolo de nosso estudo foi realizado com o intuito de instigar a instalação da fadiga por mecanismos centrais, nomeadamente, pela síntese de alguns neurotransmissores diretamente relacionados à sensação de cansaço e letargia – nesse caso, a serotonina. Para tal, escolhemos um exercício contínuo e de intensidade submáxima, uma vez que alta intensidade de exercício poderia gerar muita contribuição periférica para cessação da atividade. Apesar de nosso teste não ser conduzido até a exaustão volitiva, diferentemente de outros estudos que analisam fadiga central (Wilson e Maughan, 1992; Jacobs e Bell, 2004), muitos dos quais estão revisados no trabalho de Meeusen *et al.* (2006), podemos dizer que 40 minutos de exercício prolongado, contínuo, em intensidade de 75% do $VO_{2máx}$ foi suficiente para elevar a atividade do sistema serotoninérgico – mensurado através dos índices de prolactina. Entretanto, tanto o protocolo em cicloergômetro quanto de corrida não foram condições possíveis de causar danos à BHE, conforme mensurado através dos índices de S100B. De certa forma, imaginamos que os fatores envolvidos e potencialmente capazes de causar lesões à BHE durante exercício (ilustrados na Figura 1), necessitam de uma atividade de maior duração, ou mais intensa e de natureza diferente da que usamos, para eliciar injúrias significativas a essa estrutura cerebral.

7. CONCLUSÕES

Um protocolo de exercício de 40 minutos em intensidade de 75% do $VO_{2\text{máx}}$ conduzido em cicloergômetro e em corrida, aumentaram de maneira muito significativa os índices de DHEA e prolactina, respectivamente, em triatletas de elite. Os mesmos exercícios, no entanto, não foram capazes de elevar significativamente o marcador S100B e de cortisol, mostrando que a prática de um exercício contínuo, com ou sem impacto axial, não promoveu danos na BHE – revelando que o aumento da atividade do sistema serotoninérgico não está associado a estes danos. Nesse sentido e, comparativamente a outros trabalhos, propomos que triatletas treinados necessitam de um protocolo mais intenso, mais prolongado, ou de natureza diferente, para causar lesões significativas na BHE.

7.1 Sugestões para Futuros Estudos

Durante as últimas décadas, os estudos relativos ao metabolismo cerebral e a neurotransmissão no exercício foram, na maior parte das vezes, evidências correlativas e não causais. Nesse sentido, ainda é necessário que sejam desenvolvidas futuras pesquisas com melhor controle de todas as variáveis envolvidas (no caso do exercício), para que a detecção do envolvimento de cada fator seja facilmente mensurada. Uma vez que quase todas as variáveis envolvidas podem ser controladas, é possível criar uma relação de causa para os efeitos do exercício no cérebro.

Pesquisas que envolvem exercício no estudo da BHE são extremamente necessárias, pois reconhecidamente, esta estrutura desempenha um papel importantíssimo tanto no desporto (atuante na fadiga central), quanto na gênese de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer. O reconhecimento dos efeitos de diferentes tipos de exercício sobre a BHE torna-se, neste caso, um grande aliado no aperfeiçoamento de técnicas e futuras terapias não medicamentosas para o tratamento destas e de outras doenças neuronais. Um exemplo claro que merece maior atenção diz respeito à interferência das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na alteração do metabolismo cerebral. Freeman e Keller (2012) sugerem que as lesões causadas na BHE desempenham um papel importante neste processo. Os mesmos autores apontam ainda o stress oxidativo como um importante contribuinte para o desenvolvimento de processos neurodegenerativos e, tendo em conta que estes problemas estão – na maior parte das vezes, envolvidos em alterações na síntese de neurotransmissores, a ideia de que espécies reativas de oxigênio/nitrogênio possam contribuir nos processos de instalação da fadiga no SNC pode ser levantada. Contudo, ainda são necessários maiores estudos para que estes pressupostos sejam confirmados ou negados.

Ao mesmo tempo, deve-se ter em conta que o exercício é atuante na melhoria da saúde cerebral. Neste caso, o fato da proteína S100B apresentar atividade trófica central não pode ser descartado, uma vez que possam existir mecanismos de “compensação” oriundos do estímulo – geralmente lesão transitória pelo exercício na BHE. Esta adaptação pode promover melhorias na estrutura da barreira, diminuindo sua vulnerabilidade a agentes estressores e auxiliando no controle do metabolismo cerebral. A determinação de outros marcadores centrais (como o BDNF – *Brain Derived Neurotrophic Factor*) pode ser investigada, pois se entende que este marcador pode indicar efeitos benéficos do exercício sobre o cérebro.

Referências Bibliográficas

- Abbott, N.J. Patabendige, A.A.K. Dolman, D.E.M. Yusof, S.R. e Begley, D.J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*. 37(1): 13-25
- Anderson, R.E. e Hanson, L.O. (2001) High serum S100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery*, 48(6): 1255-8
- Andersson, J. P. Linér, M. H. e Jönsson, H. (2009). Increased serum levels of the brain damage marker S100B after apnea in trained breath-hold divers: a study including respiratory and cardiovascular observations. *Journal of applied physiology*, 107(3):809-15
- Archer, T. (2012). Influence of physical exercise on traumatic brain injury deficits: scaffolding effect. *Neurotoxicity research*, 21(4):418-34
- Azmitia, E. (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*; 56(5): 413-424
- Abdelmalki, A. Merino, D. Bonneau, D. Bigard, A.X. e Guezennec, C.Y. (1997). Administration of a GABAB agonist baclofen before running to exhaustion in the rat: Effects on performance and on some indicators of fatigue. *Int J Sports Med*, 18(2):75-78
- Agarwal, S.K. (2012). Cardiovascular benefits of exercise. *Int J Gen Med*, 5:541-5
- Baulieu, E.E. e Robel, P. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 95: 4089-4091
- Ben-Jonathan, N. e Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*, 22: 724-763
- Borg, G. (1998) Borg's Perceived Exertion and Pain Scales. *Champaign, IL*, Human Kinetics.
- Butcher, S.K. Killampalli, V. Lascelles, D. Wang, K. Alpar, E.K. e Lord, J.M. (2005) Raised cortisol:DHEAS ratios in the elderly after injury: potential impact upon neutrophil function and immunity. *Aging Cell*, 4: 319-324
- Buford, T.W. e Willoughby. D.S. (2005). Impact of DHEA(S) and cortisol on immune function in ageing: a brief review. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33: 429-433
- Brown, E. S. Varghese, F. P. e McEwen, B. S. (2004). Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biological Psychiatry*, 55(1):1-9
- Bliss, E. L. e Ailion, J. (1971) APUD Foley, T.E. e Fleshner, M. (2008). Neuroplasticity of Dopamine Circuits After Exercise: Implications for Central Fatigue. *Neuromol Med*; 10:67-80

- Bridge, M.W. Weller, A.S. Rayson, M. e Jones, D.A. (2003) Responses to exercise in the heat related to measures of hypothalamic serotonergic and dopaminergic function. *Eur J Appl Physiol* 89:451-459
- Bailey, D.M. Evans, K.A. McEneny, J. Young, I.S. Hullin, D.A. James, P.E. Ogoh, S. et al. (2011). Exercise-induced oxidative-nitrosative stress is associated with impaired dynamic cerebral autoregulation and blood-brain barrier leakage. *Experimental Physiology*, 96(11):1196-1207
- Blyth, B. J. Farhavar, A. Gee, C. Hawthorn, B. He, H. Nayak, A. Stöcklein, V. et al. (2009). Validation of serum markers for blood-brain barrier disruption in traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 26(9):1497-1507
- Bulut, M. Koksall, O. Dogan, S. Bolca, N. Ozcug, H. Korfali, E. Ilcol, Y. O. et al. (2006). Tau Protein As a Serum Marker of Brain Damage in Mild Traumatic Brain Injury : *Advances in Therapy*, 23(1):12-22
- Biron, K.E. Dickstein, D.L. Gopaul, R. e Jefferies, W. (2011) Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervascularity in Alzheimer's Disease. *PloS one*. 6(8):e23489
- Cioni, C. Turlizzi, E. Zanelli, U. Oliveri, G. e Annunziata, P. (2012). Expression of Tight Junction and Drug Efflux Transporter Proteins in an in vitro Model of Human Blood-Brain Barrier. *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 3(May):47
- Chaudhuri, A. e Behan, P. O. (2000). Fatigue and basal ganglia. *Journal of the Neurological Sciences*, 179(S 1-2):34-42
- Desai, B.S. Monahan, A.J. Carvey, P.M. e Hendey, B. (2007). Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplant*, 16(3):285-99
- Draper, N. Dickson, T. Fryer, S. Blackwell, G. Winter, D. Scarrott, C. e Ellis, G. (2012). Plasma cortisol concentrations and perceived anxiety in response to on-sight rock climbing. *Int J Sports Med*, 33(1):13-7
- Davis, J.M. e Bailey, S.P. (1997) Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 29(1):45-57
- Davis, J.M. Bailey, S.P. Jackson, D.A. et al. (1993). Effects of a serotonin (5-HT) agonist during prolonged exercise to fatigue in humans. *Med Sci Sports Exerc*. 25: S78
- Diksic, M. e Young, S. N. (2001). Study of the brain serotonergic system with labeled. *Journal of Neurochemistry*, 78:1185-1201
- Deshauer, D. Moher, D. Fergusson, D. Moher, E. Sampson, M. e Grimshaw, J. (2008). Selective serotonin reuptake inhibitors for unipolar depression: a systematic review of classic

- long-term randomized controlled trials. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 178(10):1293-301
- Daubner, S. C. Le, T. e Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(1):1-12
- Dietrich, M.O. Tort, A.B. Schaf, D.V. Farina, M. Gonçalves, C.A. Souza, D.O. e Portela, L.V. (2003). Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can J Appl Physiol*. 28(5): 710-716
- Filaire, E. Sagnol, M. Ferrand, C. e Lac, G. (2001). Psychophysiological stress in judo athletes during competitions. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 41: 263-268
- Foley, T.E. e Fleshner, M. (2008). Neuroplasticity of Dopamine Circuits After Exercise: Implications for Central Fatigue. *Neuromol Med*; 10:67-80
- Freeman, M.E. Kanyicska, B. Lerant, A. Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*; 80: 1523-631
- Freeman, L.R. e Keller, J.N. (2012). Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood–brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1822 (5): 822-829
- Fernstrom, J. D. (2005). 4th Amino Acid Assessment Workshop: Branched-Chain Amino Acids and Brain Function. *J Nutr*. (suppl10):1539-1546
- Fernstrom, J. D. (2012). Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino acids*. [doi:10.1007/s00726-012-1330-y](https://doi.org/10.1007/s00726-012-1330-y)
- Feve, A.P. (2012). Current status of tyrosine hydroxylase in management of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*; 11(4): 450-5
- Friedman, A. e Heinemann, U. (2012). Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (pp. 1-12)
- Feng, S. Cen, J. Huang, Y. Shen, H. Yao, L. Wang, Y. e Chen, Z. (2011). Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PloS one*, 6(8), e20599
- Garbuzova-Davis, S. Rodrigues, M. C. O. Hernandez-Ontiveros, D. G. Louis, M. K. Willing, A. E. Borlongan, C. V. e Sanberg, P. R. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis: a neurovascular disease. *Brain research*, 1398:113-25
- Graham, M.R. Myers, T. Evans, P. Davies, B. Cooper, S.M. Bhattacharya, K. Grace, F.M. Baker, J.S. (2011). Direct hits to the head during amateur boxing is associated with a rise in serum biomarkers for brain injury. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 24(1): 119-25

- Greenwood, B.N. e M. Fleshner (2011). Exercise, stress resistance, and central serotonergic systems. *Exerc. Sport Sci. Rev*, 39(3):140-149
- Gatti, R. e De Palo, E.F. (2011). Na update: salivary hormones and physical exercise. *Scand J Med Sci Sports*, 21:157-169
- Guyton, A. C. e Hall, J.E. (1996) Textbook of Medical Physiology. *WB Saunders Company*, Philadelphia, Ninth Edition, pp: 788; pp:1048
- Hasselblatt M, Mooren FC, von Ahsen N, Keyvani K, Fromme A, Schwarze-Eicker K, Senner V, e Paulus W. (2004). Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. *Neurology*. 62(9):1634-6
- Hawkins, R. A. Kane, R. L. O. Simpson, I. A. e Vin, J. R. (2006). Branched-Chain Amino Acids: Metabolism, Physiological Function, and Application Structure of the Blood-Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids. *J Nutr*, (6), 218-226
- Hasegawa, H. Piacentini, M. F. Sarre, S. Michotte, Y. Ishiwata, T. e Meeusen, R. (2008). Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. *The Journal of physiology*, 586(1):141-9
- Hackney, A.C. e Dobridge, J.D. (2009) Thyroid hormones and the interrelationship of cortisol and prolactina: influence of prolonged, exhaustive exercise. *Endokrynol Pol*, 60(4): 252-7
- Haenisch, B. e Bönisch, H. (2011). Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacology & therapeutics*, 129(3):352-68
- Hansen, A.M. Garde, A.H. e Persson, R. (2008) Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and their impact on measurement among healthy adults: A review. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 68(6):448-458
- Heaney, J.L.J. Carroll, D. e Phillips, A.C. (2011). DHEA, DHEA-S and cortisol responses to acute exercise in older adults in relation to exercise training status and sex. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. doi:10.1007/s11357-011-9345-y
- Haaland. D.A. Sabljic, T.F. Baribeau, D.A. Mukovozov, I.M. e Hart, L.E. (2008) Is regular exercise a friend or foe of the aging immune system? A systematic review. *Clin J Sport Med*, 18(6):539-48
- Iranmanesh, A. Rochester, D. F. Liu, J. e Veldhuis, J. D. (2011). Impaired adrenergic- and corticotropic-axis outflow during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Metabolism: clinical and experimental*, 60(11):1521-9
- Ingebrigtsen, T. e Romner, B. (2003). Biochemical serum markers for brain damage: a short review with emphasis on clinical utility in mild head injury. *Restorative neurology and neuroscience*, 21(3-4):171-6

- Jacobs, I. e Bell, D. G. (2004). Effects of acute modafinil ingestion on exercise time to exhaustion. *Med Sci Sports Exerc*, 36, 1078-1082
- Jeynes, B. e Provias, J. (2011). The case for blood-brain barrier dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*, 89(1), 22-8
- Khalil, M. Enzinger, C. Langkammer, C. Ropele, S. Mader, A. Trentini, A. Vane, M. et al. (2012). CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Multiple sclerosis*. [doi:10.1177/1352458512458010](https://doi.org/10.1177/1352458512458010)
- Kraemer, R.R. Blair, M.S. McCaferty, R. e Castracane, V.D. (1993) Running-induced alterations in growth hormone, prolactina, triiodothyronine, and thyroxine concentrations in trained and untrained men and women. *Res Q Exerc Sport*, 64(1): 69-74
- Krüger, K. Agnischock, S. Lechtermann, A. Tiwari, S. Mishra, M. Pilat, C. e Wagner, A. et al. (2011). Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. *Journal of applied physiology* 110(5):1226-32
- Klass, M. Roelands, B. Lévénez, M. Fontenelle, V. Pattyn, N. Meeusen, R. e Duchateau, J. (2012) Effects of Noradrenaline and Dopamine on Supraspinal Fatigue in Well-Trained Men. *Med Sci Sports Exerc*, 44(12):2299-308
- Kiive, E. J. Maaros, Shlik, J. Tõru, I. e Harro, J. (2004). Growth hormone, cortisol and prolactin responses to physical exercise: higher prolactin response in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28(6): 1007-13
- Karkoulas, K. I. Habeos, Charokopos, N. Tsiamita, M. Mazarakis, A. Pouli, A. e Spiropoulos, K. (2008). Hormonal responses to marathon running in non-elite athletes. *Eur J Intern Med*, 19(8): 598-601
- Liebner, S. Czupalla, C. J. e Wolburg, H. (2011). Current concepts of blood-brain barrier development. *The International journal of developmental biology*, 55(4-5), 467-76
- Low, D. Purvis, A. Reilly, T. e Cable, N.T. (2005) The prolactin responses to active and passive heating in man. *Exp Physiol*. 90:909-917
- Leite, L.H. Rodrigues, A.G. Soares, D.D. Marubayashi, U. e Coimbra, C.C. (2010). Central fatigue induced by losartan involves brain serotonin and dopamine content. *Med Sci Sports Exerc*; 42 (8):1469-76
- Lennartsson, A-K. Kushnir, M. M. Bergquist, J. e Jonsdottir, I. H. (2012). DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Biological psychology*, 90(2):143-149
- Liu, Y. e Papadopoulos, V. (2005) Biosynthesis and Regulation of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in Brain. *Treballs de la SCB*, 56, 135-145

- Marchi, N. Rasmussen, P. Kapural, M. Fazio, V. Kight, K. Mayberg, M. R. Kanner, A. et al. (2003). Peripheral markers of brain damage and blood-brain barrier dysfunction. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 21(3-4):109-21
- Mussack, T. Dvorak, J. Graf-Baumann, T. Jochum, M. (2003). Serum S100B protein levels in young amateur soccer players after controlled heading and normal exercise. *Eur J Med Res*. 8 (10): 457-64
- McCrory, P. Zazryn, T. Cameron, P. (2007). The Evidence for Chronic Traumatic Encephalopathy in Boxing. *Sports Med*; 37(6):467-476
- Meeusen, R. Watson, P. Hasegawa, H. Roelands, B. e Piacentini, M. F. (2006). Central Fatigue - The Serotonin Hypothesis and Beyond. *Sports Medicine*, 36(10):881-909
- Meeusen, R. e Roelands, B. (2010). Central fatigue and neurotransmitters, can thermoregulation be manipulated? *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 20 (Suppl 3):19-28
- Maes, M. Leonard, B.E. Myint, A.M. Kubera, M. Verkerk, R. (2011) The new '5-HT' hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*; 35: 702-721
- McMorris, T. Collard, K. Corbett, J. Dicks, M. e Swain, J. P. (2008). A test of the catecholamines hypothesis for an acute exercise-cognition interaction. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 89(1):106-15
- Moreira, A. Arsati, F. Arsati, Y.B.O. Silva, D.A. e Araújo, V.C. (2009) Salivary cortisol in top-level professional soccer players. *Eur J Appl Physiol*, 106:25-30
- Milani, R.V. Lavie, C.J. Mehra, M.R. e Ventura, H.O. (2011). Impact of exercise training and depression on survival in heart failure due to coronary heart disease. *Am J Cardiol*; 107(1):64-8
- Manenschijn, L. Spijker, A. T. Koper, J. W. Jetten, A. M. Giltay, E. J. Haffmans, J. Hoencamp, E. et al. (2012). Long-term cortisol in bipolar disorder: Associations with age of onset and psychiatric co-morbidity. *Psychoneuroendocrinology*, 37(12):1960-8
- Maninger, N. Wolkowitz, O.M. Reus, V.I. Epel, E.S. e Mellon, S.H. (2009). Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30: 65-91
- Nybo, L. e Secher, N.H. (2004). Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. *Progress in neurobiology*; 72(4):223-61

- Neselius, S. Brisby, H. Theodorsson, A. Blennow, K. Zetterberg, H. e Marcusson, J. (2012). CSF-biomarkers in Olympic boxing: diagnosis and effects of repetitive head trauma. *PLoS one*, 7(4), e33606
- Navarro, F. Bacurau, A.V. Almeida, S.S. Barros, C.C. Moraes, M.R. Pesquero, J.L. Ribeiro, S.M. Araújo, R.C. Costa Rosa, L.F. e Bacurau, R.F. (2010). Exercise prevents the effects of experimental arthritis on the metabolism and function of immune cells. *Cell Biochem Funct.* 28(4):266-73
- Otto, M. Holthusen, S. Bahn, E. Söhnchen, N. Wiltfang, J. Geese, R. Fischer, A. Reimers, C.D. (2000) Boxing and running lead to a rise in serum levels of S-100B protein. *Int J Sports Med.* 21(8):551-5
- Paulson, O.B. (2002). Blood–brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow. *European Neuropsychopharmacology*; 12: 495–501
- Pardridge, W. M. (1998). Blood-Brain Barrier Carrier-Mediated Transport and Brain Metabolism of Amino Acids. *Neurochemical Research*, 23(5), 635–644.
- Pardridge WM. (1983) Brain metabolism: a perspective from the blood–brain barrier. *Physiol Rev.* 63:1481-535.
- Pardridge, W. M. (1998). Blood-Brain Barrier Carrier-Mediated Transport and Brain Metabolism of Amino Acids. *Neurochemical Research*, 23(5), 635-644
- Porter, R.J. Gallagher, P. Watson, S. Young, A.H. (2004) Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence. *Psychopharmacology.* 173: 1-17
- Pitsiladis, Y.P. Strachan, A.T. Davidson, I. e Maughan, R.J. (2002). Hyperprolactinaemia during prolonged exercise in the heat: evidence for a centrally mediated component of fatigue in trained cyclists. *Exp Physiol*, 87(2): 215-26
- Papacosta, E. e Nassis, G.P. (2011) Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 14:424-434
- Price, L.H. Charney, D.S. Delgado, P.L. e Heninger, G.R. (1991) Serotonin function and depression: neuroendocrine and mood responses to intravenous L-tryptophan in depressed patients and healthy comparison subjects. *Am J Psychiatry*, 148(11): 1518-1525
- Phillips, A.C. Burns, V.E. e Lord, J.M. (2007) Stress and exercise: getting the balance right for aging immunity. *Exerc Sport Sci Rev*, 35: 35-39
- Reisch, N. Slawik, M. Zwermann, O. Beuschlein, F. e Reincke, M. (2005) Genetic influence of an ACTH receptor promoter polymorphism on adrenal androgen secretion. *Eur J Endocrinol*, 153(5): 711-15

- Reuster, T. Rilke, O. e Oehler, J. (2002). High correlation between salivary MHPG and CSF MHPG. *Psychopharmacology*, 162(4):415–8
- Rojas Vega, S. Hollmann, W. e Strüder, H. K. (2012). Influences of exercise and training on the circulating concentration of prolactin in humans. *Journal of neuroendocrinology*, 24(3), 395-402
- Rossi, L. e Tirapegui, J. (2004) Sistema Serotoninérgico e Exercício Físico. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 48(2): 227-233
- Roelands, B. e Meeusen, R. (2010). Alterations in central fatigue by pharmacological manipulations of neurotransmitters in normal and high ambient temperature. *Sports medicine*, 40(3):229-46
- Riechman, S.E. Fabian, T.J. Kroboth, P.D. Ferrell, R.E. (2004) Steroid sulfatase gene variation and DHEA responsiveness to resistance exercise in MERET. *Physiol Genomics*, 17(3):300-6
- Starr, J. M. Farrall, A. J. Armitage, P. McGurn, B. e Wardlaw, J. (2009). Blood-brain barrier permeability in Alzheimer's disease: a case-control MRI study. *Psychiatry Research*, 171(3):232-41
- Stalnacke, B. e Sojka, P. (2008). Repeatedly Heading a Soccer Ball Does Not Increase Serum Levels of S-100B, a Biochemical Marker of Brain Tissue Damage: an Experimental Study. *Biomarker Insights*. 3: 87-91
- Stalnacke, B. Ohlsson, A. Tegner, Y. Sojka, P. (2006). Serum concentrations of two biochemical markers of brain tissue damage S-100B and neurone specific enolase are increased in elite female soccer players after a competitive game. *Br J Sports Med*; 40:313-316
- Schulte, S. Schiffer, T. Sperlich, B. Kleinoder, H. Holmberg, H.C. (2011). Serum Concentrations of S100B are not Affected by Cycling to Exhaustion With or Without Vibration. *Journal of Human Kinetics*. 30: 59-63
- Stalnacke, B.M. Tegner, Y. e Sojka, P. (2003). Playing ice hockey and basketball increases serum levels of S-100B in elite players: a pilot study. *Clin J Sport Med*, 13(5): 292-302
- Smith, Q. R. (2000). Glutamate and Glutamine in the Brain Transport of Glutamate and Other Amino Acids at the Blood-Brain Barrier. *Journal of Nutrition*, 130:1016-1022
- Strüder, H.K. e Weicker, H. (2001). Physiology and Pathophysiology of the Serotonergic System and its Implications on Mental and Physical Performance. Part 1. *Int J Sports Med*. 22: 467-481
- Strüder, H. K. Hollmann, W. Platen, P. Wöstmann, R. Weicker, H. Molderings, G.J. (1999). Effect of acute and chronic exercise on plasma amino acids and prolactin concentrations and on [3H] ketanserin binding to serotonin 2A receptors on human platelets. *Eur J Appl Physiol*. 79:318-324

- Strüder, H.K. Hollman, W. Platen, P. Wöstmann, R. Ferrauti, A. e Weber, K. (1997) Effect of exercise intensity on free tryptophan to branched-chain amino acids ratio in plasma prolactina during endurance exercise. *Can J Appl Physiol*, 22(3): 280-291
- Schueler, Y.B. Koesters, M. et al. 2011. A systematic review of duloxetine and venlafaxine in major depression, including unpublished data. *Acta Psychiatr Scand*. 123: 247-265
- Stokes, K.A. Gilbert, K.L. Hall, G.M. Andrews, R.C. e Thompson, D. (2012) Different responses of selected hormones to three types of exercise in young men. *Eur J Appl Physiol*. Sep 13
- Stocchero, C.M.A. (2009). Efeito do Exercício sobre os níveis sanguíneos de proteínas marcadoras de lesão muscular e da proteína S100B em Triatletas Treinados. Tese de Doutorado / Porto Alegre: UFRGS, 2009
- Stocchero, C.M.A. Oses, J. P. Martins, J. et al. (2010). Serum S100B levels in triathletes after different types of exercise. In: American College of Sports Medicine Annual Meeting, Baltimore, USA. *Medicine and Science in Sports and Exercise*; 42: S554-S554
- Shabani, S. Dehghani, M. Hedayati, M. e Rezaei, O. (2011). Relationship of serum serotonin and salivary cortisol with sensation seeking. *International Journal of Psychophysiology*, 81: 225-229
- Theorell, T. (2008). Anabolism and catabolism - antagonistic partners in stress and strain. *SJWEH (Supplement)*: 136-143
- Thorsley, D. Leproult, R. Spiegel, K. e Reifman, J. (2012). A phenomenological model for circadian and sleep allostatic modulation of plasma cortisol concentration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303(10):E1190-201
- Trivedi, M.H. Greer, T.L. Grannemann, B.D. Chambliss, H.O. e Jordan, A.N. (2006) Exercise as an augmentation strategy for treatment of major depression. *J Psychiatr Pract*. 12(4):205-13
- Tumilty, L. Davison, G. Beckmann, M. e Thatcher, R. (2011). Oral tyrosine supplementation improves exercise capacity in the heat. *Eur J Appl Physiol*, 111(12):2941-50
- Van de Kar, L.D. Rittenhous, P.A. Qian, L. Levy, A.D. (1996) Serotonergic regulation of renin and prolactin secretion. *Behav Brain Res*, 13: 237-246
- VanBruggen, M.D. Hackney, A.C. McMurray, R.G. Ondrak, K.S. (2011) The Relationship between Serum and Salivary Cortisol Levels in Response to Different Intensities of Exercise. *International Journal of Sports Physiology and Performance*. 6: 396-407
- Viru, A. e Viru, M. (2001) Biochemical Monitoring of Sport Training. Human Kinetics; Champaign, IL. pp:81

- Zhong, H. Haddjeri, N. e Sánchez, C. (2012). Escitalopram, an antidepressant with an allosteric effect at the serotonin transporter - a review of current understanding of its mechanism of action. *Psychopharmacology*, 219(1):1-13
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178–201
- Wright, H. E. Selkirk, G. Rhind, S. G. e McLellan, T. M. (2012). Peripheral markers of central fatigue in trained and untrained during uncompensable heat stress. *European journal of applied physiology*, 112(3):1047-57
- Watson, P., Shirreffs, S. M., & Maughan, R. J. (2005). Blood-brain barrier integrity may be threatened by exercise in a warm environment. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(6):R1689-94
- Watson, P. Enever, S. Page, A. Stockwell, J. e Maughan, R. J. (2012). Tyrosine supplementation does not influence the capacity to perform prolonged exercise in a warm environment. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 22(5):363-73
- Watson, P. Shirreffs, S. M. e Maughan, R. J. (2004). The effect of acute branched-chain amino acid supplementation on prolonged exercise capacity in a warm environment. *European journal of applied physiology*, 93(3):306-14
- Wipfli, B. Landers, D. Nagoshi, C. e Ringenbach, S. (2011). An examination of serotonin and psychological variables in the relationship between exercise and mental health. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 21(3), 474-81
- Wilson, W.M. e Maughan, R.J. (1992) Evidence for a possible role of 5-hydroxytryptamine in the genesis of fatigue in man: administration of paroxetine, a 5-HT re-uptake inhibitor, reduces the capacity to perform prolonged exercise. *Exp Physiol*, 77(6): 921-924
- Yamamoto, T. E. Newsholme, E.A. (2000) Diminished central fatigue by inhibition of the L-system transporter for the uptake of tryptophan. *Brain Research Bulletin*; 52(1): 35-38

ANEXOS

ANEXO 1

Artigo prévio de Revisão – em correção – a ser submetido a periódico.

Review Paper

PROVISORY TITLE: EXERCISE AND BLOOD-BRAIN BARRIER DYSFUNCTION – WHAT MECHANISMS ARE INVOLVED?

Matheus Uba Chupel¹

Ana Teixeira¹

Alain Massart¹

Edith Filaire²

¹Faculty of Sport Science and Physical Education – University of Coimbra – Portugal

² UFRSTAPS, Université Orléans, France

To whom correspondence should be addressed:

Matheus Uba Chupel

Biokinetics Laboratory Research

Faculty of Sport Science and Physical Education – University of Coimbra

Estádio Universitário – Pavilhão 3 / Santa Clara

3040-156 – Coimbra

Portugal

matheusuba@hotmail.com

+(351)239 802 770

PROVISORY TITLE: EXERCISE AND BLOOD-BRAIN BARRIER DYSFUNCTION – WHAT MECHANISMS ARE INVOLVED?

Abstract

The Blood-Brain Barrier is an important structure that controls the stable microenvironment between blood to the CNS and CNS for blood. Dysfunctions in own structure are intimate associated with neurodegenerative diseases, including Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease. Admittedly, the exercise is able to improve numerous physiological functions, decreasing the risk of infection and supporting in treatment of neurodegenerative process. However, not long time ago were exposed the harms to which the practitioners exercise could be vulnerable and, in this case, began to emerge some evidence pointing the possible brain damage that physical activity can promote. In this case, almost all evidence are linked to the following factor: the blood-brain barrier dysfunction. Thus, the main objective of this brief review is to summarize the limited studies that have investigated this topic and present the possible mechanisms involved. It is to our knowledge the first review involving exercise and BBB dysfunction.

Key-words: exercise; blood-brain barrier; dysfunction; permeability;

Introduction

Neural signalling within the central nervous system (CNS) requires a highly controlled microenvironment, and one of the key interfaces form barriers between the blood and the CNS is the blood-brain barrier (BBB) (Abbott et al. 2010). The BBB is a lipophilic membrane located between the endothelial cells in the brain that are connected by tight junctions (TJ), not allowing any mass flow of water and solutes (Paulson, 2002). These structures known as TJ are essentially responsible for the restriction and control of the paracellular flux between the endothelial and epithelial cells (Liebner et al., 2011). The term "barrier" was coined by Lewandowsky, who noted that neurotoxic compounds led to neuronal cell death only if applied directly to the brain, but not after systemic injection on vascular circulation (Liebner et al., 2011).

Evidence points to a high incidence of neurodegenerative diseases associated with disorders of the blood-brain barrier, as changes in their permeability (Biron et al. 2011; Starr et al. 2009) and modulation and deterioration of the TJ occur (Cioni et al. 2012; Feng et al. 2011).The deterioration of the BBB, due to breakage of TJ, alters the transport of molecules between blood and brain and brain and blood, being that important mechanisms such as brain hypoperfusion and inflammatory responses can start or contribute to a "vicious circle" (Zlokovic, 2008) in the genesis of many neural diseases. A series of associated disorders can result in progressive neuronal synaptic dysfunction and neurodegenerative processes, triggering disorders like Alzheimer's Disease (Jeynes and Provias, 2011), Parkinson's Disease (Desai et al. 2007), Amyotrophic Lateral Sclerosis (Garbuzova-Davis et al. 2011), Epilepsy (Friedman and Heinemann, 2012; Weissberg et al. 2011), Multiple Sclerosis, and others (Zlokovic, 2008).

There are numerous studies, in a wide variety of settings, which firmly establish evidence for the oxidation of proteins, lipids, sugars and nucleic acids, occurring in most (if not all) neurodegenerative diseases (Freeman and Keller, 2012). Even knowing that exercise can increase oxidation - by the oxidative stress pathway (Fisher-Wellman e Bloomer, 20009), it is still far from fully understood how these associations do happen and if, eventually, the practice of exercise can compromise/interact with

these processes at the cerebral level. The BBB, in this case, can assume a key role in controlling the synthesis of some brain hormones, and on the brain metabolism in general.

Most of the research that investigated exercise-induced BBB injuries was based on the study of the impacts – the main factor responsible for traumatic brain injury (TBI), in possible barrier permeability during sports practice. Other hypothesis that suggest damage to BBB mediated by exercise include heat or dehydration, however, it is unanimous to say that head impacts involved in the practice of some sports are able to initiate lesions on BBB.

Terms used for mild, acute head injuries are concussion or mild traumatic brain injury (MTBI) (Neselius et al. 2012). There is a very intimate relationship between TBI and lesions in the blood-brain barrier, because these lesions are commonly documented in patients with TBI (see reviews of Shlosberg et al. 2010; Chodobski et al. 2011). Thus, the main objective of this brief review is to summarize the limited studies that have investigated this topic and present the possible mechanisms involved. It is to our knowledge the first review involving exercise and BBB dysfunction.

METHODS

An extensive literature search was performed in the online search databases Pubmed and SportDiscus. The major search terms were 'exercise' and 'blood-brain barrier', in combination with 'dysfunction', 'permeability', 'damage', 'S100B' and 'NSE'. In an effort to include all available articles, reference lists were reviewed for additional relevant articles, and the literature search was not limited to English language articles.

In our review, we decide to use only studies with the human model as an inclusion criterion (table 1.0), however, experimental studies with animals were used to discuss mechanisms where blood-brain barrier is compromised – but these investigations are not included in table.

The table was designed to include information about the year of study, subjects, exercise protocol, condition, marker used to analyze blood-brain barrier permeability/damage, measurement times and results (represented by mean values).

A total number of 20 (twenty) articles were included in the review table, being that the oldest study raised was held in 2000.

EXERCISE AND BBB DYSFUNCTION

In a generally context, it is common to say that exercise promotes improvements on many physical functions. These improvements are directly associated with increased quality of life and resistance to diseases and infection (Rogers et al. 2008)

On the other hand, numerous studies have emerged in the last decade in order to verify the effects of certain types of exercise in biomarkers of BBB injuries, and analyzing the reasons why exercise could act as a "villain" - i.e. promoting damage at the cerebral level. In some cases, the execution of certain types of exercises - in specific situations - can exert a "double-edged sword" effect when, at the same time, their practice has beneficial and deleterious effects (Griesbach, 2011).

In this sense, over time, there has been an increased trend in indices of neuronal problems presented by some athletes (Kaste et al. 1982), being observed that some types of activities were likely to cause brain damage.

As a result, during the last decade there were several studies which have proposed to look at the effects of certain types of exercise, performed in different settings, in the biomarker indexes of neuronal injury, where it was noted that the deterioration of the BBB had a key role in triggering these processes. Figure 1 presents some of the reported factors involved in BBB permeability during exercise.

MARKERS USED TO ACCESS THE BBB PERMEABILITY - CAREFUL INTERPRETATION OF RESULTS

Most studies into brain damage, including that used exercise effect, have focused on neuronal damage, because this is the cause of most deficits from neurological disease (Marchi et al. 2004). Due the difficulty in accessing the integrity of the blood-brain barrier directly, especially in human studies, some peripheral markers are commonly used to access BBB damage.

The standard markers of the BBB injury and neuronal damage share some characteristics, and are consensual to establish that normal individuals have low (or undetectable) levels. When both blood-brain barrier opening and neuronal damage are present, plasma levels of both markers would be expected to exceed normal levels (Barregard et al. 1990) presenting different responses in blood levels correlated to the severity of damage (Marchi et al. 2004).

Due much of studies involve neuronal damage, many researches on peripherals markers has focused on biochemical parameters that measure neuronal damage. However, as most neurological problems are accompanied by increased permeability of the BBB, these markers may indicate BBB leakage or dysfunction (Marchi et al. 2004).

These include the protein S-100B, Neuron Specific Enolase (NSE), and Glial Fibrillary Acidic Protein - GFAP (Marchi et al. 2003). The use of peripheral markers as T-Tau (Bulut et al. 2006), and neurofilament light protein (NFL) (Rosén et al. 2004), also are useful to analyze neuronal damage in some cases. The analysis of cerebrospinal fluid biomarkers can help understand the pathology of brain injuries at the cellular level, and may also play a key role in clinical practice (Neselius et al. 2012).

The barrier is usually impervious to protein S-100B, but it can leave the brain into peripheral circulation under various forms (Marchi et al. 2004). S100B are correlated directly with the extent and BBB dysfunction, further suggesting that is a marker of BBB permeability (Kanner et al. 2003). Compared to other markers, S100B protein utilization has reliable accuracy and allows for a relatively non-invasive method to access BBB permeability (Blyth et al. 2009), as can be inferred in some works (Marchi et al. 2003; Ingebrigtsen and Romner, 2003). In normal subjects, S100B levels in plasma are extremely low compared than levels found in the cerebrospinal fluids (CSF) (McKhann et al. 1997), suggesting that a increase in S100B indicate BBB opening (Marchi et al. 2004).

Nevertheless, the literature suggests that there are several mechanisms able to promote changes in this marker, including the influence of serotonin activation (Dietrich et al. 2003; Rothermundet al. 2003), and other extracranial sources as adipose tissue (Pham et al. 2010), that are identified as the responsible factor by elevation this marker without changes in brain structure, which can confuse the interpretation

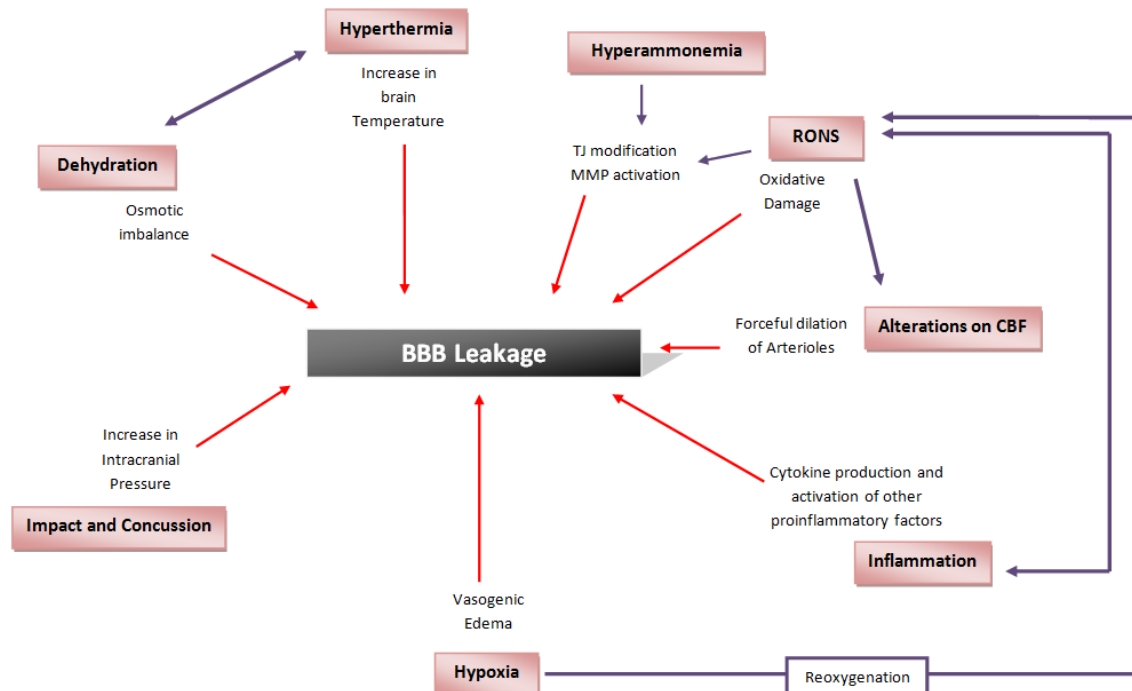
of results. The origin of S100B from other cells (particularly chondrocytes and bonemarrow) has been described in the case of traumatism, also suggesting a dependence on cell integrity (Gonçalves et al. 2008). As the most research involving this type of studies are correlative, it is difficult to conclude categorically that there is causal relationship between changes in the level of biomarkers to injuries in the blood-brain barrier.

However, as the extracranial sources of S100B do not affect serum levels (Pham et al. 2010), we believe that the increase of this marker reflects BBB dysfunction.

Studies involving Exercise and Blood-Brain Barrier Dysfunction – What we know?

Activities that involve head impact have been exhaustively researched (Mussack et al. 2003; Stalnacke and Sojka, 2008; Neselius et al. 2012; Graham et al. 2011), because there are serious evidence pointing to the association between head trauma and neurodegenerative diseases (McCrory et al. 2007), often associated with developmental disorders caused in BBB due to impacts (Archer, 2012). However, research involving other activities – in addition to amateur and professional boxing (Graham et al. 2011; Otto et al. 2000), other activities also looked at changes in the permeability of the BBB in sports like soccer (Stalnacke et al. 2006), marathon race (Hasselblatt et al. 2004), cycling (Schulte et al. 2011; Bailey et al. 2011), hockey (Stalnacke et al. 2003), swimming (Dietrich et al. 2003). Sports with and without axial impact, were used to check the possible effects of these activities on biomarkers of brain and BBB injury.

Figure 1. A new suggestive model of factors involved in BBB permeability during exercise



BBB: blood-brain barrier; **CBF:** cerebral blood flow; **RONS:** reactive oxygen/nitrogen species; **TJ:** tight junction; **MMP:** matrix-metalloproteinases

EXERCISE AND BBB DYSFUNCTION – WHAT ARE THE VARIABLES INVOLVED?

As described earlier, some physical exercises constitute a "double-edged sword" when talking about brain injuries. Even so, the exercise may not be seen as a "villain" to health, since the benefits from this activity are key components in promoting people's quality of life. Even taking into account some evidence pointing to the deleterious effects of some sports on BBB, exercise is still one of the best existing methods for prevention/treatment of individuals with neurodegenerative diseases. This is because the injuries in the blood-brain barrier induced by exercise have a transient aspect, and the affected structures tend to return to normal after the cessation of activity (Andersson et al. 2009). With the exception of the exercises that involve great impact and head trauma (e.g. boxing), the transitional effect of injuries has low magnitude and does not pose a risk to the brain tissue (Andersson et al. 2009). The problem seems to start to occur when there is frequent repetition of the generating conditions of impact, which contributes to the increase/advance of barrier permeability and inherent disorders.

There is consensus in saying that TBI currently constitute a factor capable of increasing the permeability of the blood-brain barrier (Yan et al. 2012; Vajtr et al. 2009). A common cause of brain injuries are the mechanical shocks in the head, acting as external forces, which result in damage to the brain tissue (Archer, 2012). The vast majority of falls and concussion (causing impacts) in athletes generate brain injury classified as mild traumatic brain injury (MTBI). Loss of consciousness is not normally present, and post-traumatic amnesia occurs for a short period of time. This type of injury is probably associated with low levels of axonal stretching, which results in temporary neurophysiological changes (Moser et al. 2007).

In relation to gender differences, the modulation through the blood-brain barrier of some transporter mechanisms varies from male to female (Van Assema et al. 2012) however, the resistance of the BBB to stressor agents that occur in sports – comparatively in men and in women is still unknown. Since women have less body mass than men athletes, the hypothesis that they are more vulnerable to incidence of brain injury is possible, which can increase the risk of the appearance of these injuries. However, female football players exhibited a similar increase in the concentration of brain injury markers in relation to number of traumatic events, than the male athletes (Stalnacke et al. 2006).

Age can also be a factor able to condition the permeability of the BBB and, in this case, young athletes aged between 12 and 15 years old showed values of injury markers in the BBB significantly greater than those with 16-17 years old, being that the transitional increase is independent of initial values related to age (Mussack et al. 2003). S100B serum concentrations exhibit a negative correlation with age in the first 20 years of life (Portela et al. 2002). Studies that involved exercise with adolescents and young adults showed a greater variability of S100B at baseline and post exercise (Dietrich et al. 2003; Schulpis et al. 2007; Chevront et al. 2008), when compared with adults (Stocchero et al. 2010a).

IMPACTS AND CONCUSSION IN SPORTS – AN "OPEN DOOR" TO BBB DYSFUNCTION

In the sports context, activities such as boxing reveal an increase in blood levels of S100B (Otto et al. 2000). The same author shows that the practice of boxing without protection in the head provided a significantly higher increase in this marker, when comparing to the athletes who used protection. This may demonstrate that the magnitude of elevation of brain injury is directly related to the intensity of the impact, since the levels of S100B seem to increase with greater magnitude in boxing that involves blows to the head (Graham et al. 2011). An increase of T-tau, NFL, GFAP and S-100B in boxers demonstrates

that the acute and cumulative effects of head trauma in boxing may induce changes in cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers, suggesting small lesions in the central nervous system (Neselius et al. 2012).

As regard to the impacts involved in the practice of other contact sports, the results are conflicting, because not all activities that involve impact events of abrupt acceleration/deceleration were likely to increase the level of brain injury markers (Woertgen et al. 2002; Stalnacke and Sojka, 2008).

The abrupt acceleration/deceleration of the skull can also lead to a rotational or linear movement through which the brain tissue moves against itself inside the skull (Barth et al., 2001), increasing the risk of brain injury.

During the past few years some concerns about the soccer game have been raised, questioning if the practice of consecutive heading on the ball is dangerous to the brain (Stalnacke et al. 2006). It was found that training and soccer games cause a transient increase in S100B, with possible additive effect of high intensity and heading in relation to levels of this protein (Straume-Naesheim et al. 2008). However, not every type of header can lead to brain damage, heading a soccer ball falling from a height of 18 m did not cause a significant increase in S100B concentration, indicating that this impact was not enough to cause injury to the BBB (Stalnacke and Sojka, 2008). The concentrations of both, S100B and NSE, have been shown to increase after a soccer game, with a significant correlation between changes in S100B levels and the number of headings and collisions (Stalnacke et al. 2006).

As described earlier, it is suggested that high-impact activities – which can cause TBI - are able to promote damage in the structure of the BBB, producing neural problems (Tomkins et al. 2011). In TBI an impact generates contact forces of high magnitude and short duration, and usually also a sudden change of motion, which in turn, generates inertial forces, which are able to cause structural brain damage (Woertgen et al., 2002). However, this does not seem to apply to sports that feature low impact forces to the brain or acceleration/deceleration effects (Stocchero et al. 2010b), since bungee jump practice did not increase S100B levels (Woertgen et al. 2002). The repetition of controlled heading in young amateur soccer players also led to a transient increase between 60 to 360 min after training (Mussack et al. 2003), suggesting a temporary opening of BBB, that as indicated, does not seem to evoke a more lasting S-100B release blood induced cell damage to the brain. On the other hand, there is a significant increase of S100B after practice of ice hockey and basketball, with a significant correlation with the jumping events and acceleration/deceleration of the basketball game, without significant changes in NSE (Stalnacke and Tegner, 2003).

The execution of a running exercise can also promote a small permeability of the blood-brain barrier – it is speculated that this could be due to the axial vibration caused by each step (Otto et al. 2000), - significant increases of BBB injury markers are not expected in activities without impact. In fact, significant increases were not observed in cycling under normal conditions (Schulte et al. 2011; Stocchero et al. 2010a; Otto et al. 2000), showing that this kind of activity does not promote significantly damage to the BBB. The vibration applied (in the lower limbs) during an exercise conducted in bicycle did not promote increases in these markers (Schulte et al. 2011), which shows that the association existing between impact and deterioration of the BBB is more related to contact sports (Stalnacke et al. 2006) or direct impacts on the head (Otto et al. 2000).

BBB DYSFUNCTION IN HOT CONDITIONS

Maintaining good performance of an exercise conducted in the heat is a real challenge to the body, since the high temperature and humidity present interact to cause a series of physiological and metabolic modifications in the athlete. In this sense where brain metabolism is highly influenced by heat (Nybo, 2012), BBB assumes a key role in the maintenance of its own structure and balance between the peripheral circulation and the CNS.

A number of studies – that were addressed in comprehensive reviews (González-Alonso, 2007; Nielsen and Nybo, 2003), showed that the exercise carried in hyperthermia influence more deeply some physiological functions, resulting in changes of cerebral metabolism. Relative to this, it is perfectly acceptable that the BBB plays a key role in this process, because there are studies that have pointed out that the exercise carried out in hot environments promotes further deterioration of this barrier (Watson et al. 2005). Knowing that the permeability of the BBB is able to significantly influence brain metabolism and, plus to the fact that performing exercise in extreme environments alters many bodily functions, it is possible to associate deaths occurring in practicing exercises in hot environments to possible dysfunction of BBB (Sharma, 2005).

Brain temperature affects BBB permeability in different brain structures (Sharma and Hoopes, 2003), including brain capillaries and the choroid plexus, where profound morphologic alterations have been seen in hyperthermic brains, suggesting that high temperature also affects the blood-cerebrospinal fluid barrier (Kiyatkin and Sharma, 2009).

Watson et al. (2006) investigated S100B serum levels after exercise in hot environment, with and without water intake. The increased levels of S100B after exercise were smaller with fluid intake when compared to the ones obtained with the same protocol without the liquid intake. This suggests that water intake can limit the increase in exercise-induced S100B, indicating a higher preservation of the BBB. This is supported by some evidence that points to an increase in serum levels of S-100B with exercise carried in the heat is partially mitigated by the ingestion of water, which helps to keep the plasma osmolarity (Watson et al. 2006). This can be associated with better control of osmotic balance by BBB, decreasing the permeability and deterioration occurring in situations of heat and dehydration (Maughan, 2010). In this way, is suggested that hydration during exercise in hot environments proves to be extremely important in preserving the integrity of the BBB, decreasing effects inherent to BBB dysfunction and helping to maintaining exercise performance.

Taking into account that some studies have failed to find significant associations between body temperature and changes in S100B levels (Watson et al. 2005) reinforces the idea that other factors may also be involved in the case of injury to the BBB. It is possible that changes in the integrity of BBB require severe hyperthermia (Jeliazkova-Mecheva et al. 2006), since other factors - such as the intensity of exercise - can explain the elevation of S100B often observed during an activity (Cheuvront et al. 2008).

HYPERAMMONEMIA AND EXERCISE – POSSIBLE LINK TO BBB PERMEABILITY

Nybo et al. (2005) showed that prolonged exercise causes the ammonia uptake by the brain, increasing its concentration in the cerebrospinal fluid. Taking into account that besides admittedly affecting the metabolism and function of the nervous system cells, ammonia is capable of influencing the different molecules that pass across the BBB (Skowronski and Albrecht, 2012), many questions were raised regarding the effects of ammonia on cerebral metabolism during prolonged exercise. The latest

evidence confirms that hyperammonemia produces subtle changes in the integrity of the BBB, but part of the mechanisms have not yet been completely revealed and understood (Skowronski and Albrecht, 2012).

Recently, this synergistic relationship between ammonia and inflammation in the pathogenesis of increased cerebral blood flow and intracranial pressure was confirmed (Jalan et al. 2004). Knowing that an increase in the production of ammonia can be mediated by the practice of prolonged exercise (Snow et al. 2000), BBB disruption can be expected. To support that, there are a neurophysiologic evidence for the concept of hyperammonemia-induced, functional, non specific increased permeability of BBB, also suggesting that hyperammonemia could 'unlock' the otherwise histologically intact BBB (Jalan and Bernuau, 2007; Pedersen et al. 2007). Cauli et al. (2011) observed that progressive intracranial pressure during ALF is closely correlated with the increase in the BBB permeability and the MMP-9 content. Based on this study, the authors proposed a sequence of events of brain damage induced by ALF, in which the increased permeability of BBB is an initial step, leading to vasogenic edema followed by ammonia excitotoxicity and cytotoxic edema.

ARE THERE MORE MECHANISMS INVOLVED IN BBB PERMEABILITY DURING EXERCISE?

In addition to the factors involved in some exercises like the impact, heat and dehydration, which often interact to promote BBB injuries, other mechanisms are involved in this process and in need of some attention. In some cases, some factors are able to significantly raise the levels of injury markers in BBB without necessarily have incurred significant damage in brain structure.

An increase of S100B can be attributed to suffocation or other physiological responses of apnea, for example, as an increase in blood pressure, probably indicating a temporary opening of the blood-brain barrier (Andersson et al. 2009). It is not possible to conclude that the observed increase in S100B levels after a apnea of maximal duration reflects a serious injury in the brain, since this increase has a rapid and transient nature. However, the results raise concerns if considering the negative effects of long-term practice (Andersson et al. 2009). The practice of diving in apnea results in a small increase in the levels of markers of brain injury, but this increase is not significant. This suggests that under experimental conditions the diving does not seem to promote damage to the integrity of the CNS (Stavrinou et al. 2011).

The stimulus to serotonin receptors (5-HT₁) is also pointed as a factor responsible for the increase in lesion biomarkers of BBB without necessarily occurring an increased permeability of this structure. The increase of intracellular content and release of S100 β by astrocytes (Azmitia et al., 1992; Haring et al., 1993), points to a possible interaction between S100 β and serotonin in physiological conditions (Dietrich et al. 2003). Some data also report that increases in serum levels of S100 β after a exercise bout can be related properly to exercise, regardless of damage to the CNS (Dietrich et al. 2003). In fact, the same authors showed an increase in the levels of S100 β , compared to baseline, after an exercise session without traumas caused by axial vibration in the brain (7600m swimming). On possible mechanisms involved in this increase it was postulated that this could be due to the release of S100B by the CNS, triggered by serotonin stimulation. This hypothesis is reinforced by the fact that treatment with a tryptophan hydroxylase inhibitor (enzyme responsible for serotonin synthesis) decreases the expression of S100 β (Eriksen et al., 2002). The increase in prolactin levels after exercise can represent an increase in serotonin, which in turn would act more on 5-HT_{1A} receptors releasing more S100 β into the

peripheral circulation. However, as the elevation of both of prolactin and S100 β after a swimming test were not correlated, it is not possible to entirely associate the central serotonin activity with peripheral S100B levels (Dietrich et al. 2003).

Kaur and Ling (2008) have shown that damage to the blood-brain barrier is also associated with hypoxia and re-oxygenation events. It is suggested that much of the cellular damage caused by hypoxia occurs during the subsequent re-oxygenation phase, these events being associated with an increased production of reactive oxygen species (ROS) (Wong and Crack, 2008). Knowing that exercise causes increased production of ROS, it is possible to admit that the increased permeability of the blood-brain barrier can be promoted by the accentuation of the oxidative state during prolonged exercise.

As reviewed by Pun and co-workers (2009), ROS can affect the permeability of BBB by a variety of mechanisms, including modulation of the tight junctions and the activation of metalloproteinases. This may contribute to brain injury, because free radicals react with proteins, lipids and nucleic acids present in the barrier (Lochhead et al. 2010). During inflammation periods – e.g. induced by ROS formation - it is likely that a generic mechanism of BBB permeability change does exist whereby cytokine production and release both systemically and locally within the brain can influence the neurovascular unit and increase passive permeability of the BBB and leucocyte migration (Stolp and Dziegielewska, 2009). Freeman and Keller (2012) demonstrated that although representing a global elevation of oxidative stress, an increase in levels of vascular oxidation is enough to promote harmful changes in the blood flow and in the integrity of the blood-brain barrier, serving as an initiator factor for several lines of pathogenesis in the brain.

Taking into account a vast array of studies that clearly indicate that the practice of exercise can cause an increase in the production of ROS, exercise could contribute to the installation of oxidative stress (Fisher-Welmann and Bloomer, 2009), although more research is needed to investigate whether this elevation is able to interfere with the dysfunction of BBB in an exercise condition. In our revision (see Table 1), very few studies have associated parameters of oxidation and BBB injuries.

Intense exercise has the potential to increase the permeability of the BBB without causing structural damage after impairment mediated by free radicals in cerebral autoregulation (Bailey et al. 2011). The same authors suggest that disorders around cerebral autoregulation, hemodynamic stress induced by exercise would increase BBB permeability, as indicated by the systemic accumulation of S100B protein. With exercise, the intraluminal pressure can rise in the arterioles and capillaries, that may result in forceful dilation of segments of the arterioles leading to caliber variations and BBB damage. If the high pressure is maintained, brain edema may develop with a possible secondary flow decrease (Paulson, 2002). However, the inverse relationship observed between S100 β and autoregulation index suggests that the increase in S100 β is related to BBB, in that impaired dynamic cerebral autoregulation may have preceded BBB disruption, which is conceivable, given that intense exercise can increase systolic blood pressure beyond the autoregulatory range in the brain (Bailey et al. 2011).

Some parameters may complicate the interpretation of results, as can be inferred in some investigations. The idea that exercise can increase the levels of S100B sourced from extracranial sources is suggested by studies that found a strong relationship between this protein and creatine kinase (CK) (Schulpis et al. 2007; Hasselblat et al. 2004), and can be a consequence of the increased release of S100B by lipolysis (Schulpis et al. 2007), since it is permissible that the adipose tissue can release this protein (Gonçalves et al. 2010).

Although the extracranial sources of S100B do not affect serum levels (Pham et al. 2010), these evidences suggest that exercise can promote increases of this marker due to other factors that are not related by BBB injury. The high correlation observed between CK and S100B levels after a marathon race can explain the origin of extracranial sources of S100B, and determining CK can improve the specificity of S100B as a marker of brain tissue damage in acute trauma (Hasselblatt et al. 2004).

In conclusion, there is a need of more studies, we only find 20 experimental studies that make the link between BBB and exercise (see Table 1). Since we have a lot of differences between the protocols, it is difficult to reach some consensus and to determine what the impact of exercise on illness is.

Table 1: Studies involving Exercise and Blood-Brain Barrier Disruption

Nº	References	Subjects	Protocol	Condition	Marker	Measurement times	Results	Comment
01	Otto et al. (2000)	25M boxers 11M runners(1) 12M jogging 12M runners 12M cyclists 12M headers	- Boxer - 25km race - 10000m jogging - Tartan track (2min x 3 sets) - 3x2min cycling at 200-375W 20 headers in a ball dropped from 7,5m	Normal	S100B	Before and 15min after each exercise	↑ 89ng/L [#] Boxe ↑ 66ng/L [#] 25km Race ↑ 38,3ng/L [#] jogging ↑ 23ng/L [#] tartan track ↑ 0,3 ng/L [#] cycling ↑ 1,3 ng/L [#] headers	Increase in S100B that occurs in amateur sparring boxing are similar to those occurring during jogging or running, but that competitive boxing causes higher levels and that in professional boxing much higher levels are to be expected
02	Dietrich et al. 2003	16M	Swimming 7600m	Swimming Race	S100B	Pre (24h before) and Post (15 min after) race	↑ 33,31 pg/ml* [#]	Metabolic responses to endurance exercise increase CNS 5-HT synthesis, which could be implicated in the release of S100B by astrocytes
03	Mussack et al. 2003	61M + 58M	Controlled heading forehead for 55min compared with 61min of normal exercise without head contact	Soccer training	S100B	Pre and Post (heading 30 and 360 min after; Exercise 64 and 355 min)	↑ 0,03 ng/ml in heading group.	Transient increase between 60 to 360 min after training, but does not appear to evoke a longer lasting S-100B
04	Stalnacke et al. (2003)	26M hockey players + 18 basketball players	Hockey and Basketball game		S100B NSE	Pre, Post	↑ 0,072 [#] µg/l in Ice Hockey; ↑ 0,076 [#] µg/l in basketball (in basketball S100B post-game was correlated	S100B was released into the blood of the players as a consequence of game-related activities and events

							with jumps); ↔NSE	
05	Hasselblatt et al. (2004)	18 marathon runners	Marathon Race	Run 42km	S100B CK	Pre, Post race	↑S100B correlated with CK	Authors purpose that serum S100B increases after running originate from extracranial sources
06	Watson et al. 2005	7M	60min of cycle exercise at 60% VO _{2peak}	Temperate (T) and Warm (W) conditions.	S100B	Pre-post exercise	W= ↑ 0,12 µg/l [#]	Warm environment increase BBB permeability
07	Watson et al. 2006	8M	90min at 55%VO _{2peak}	Warm – With (F) and Without (NF) fluid ingestion	S100B	Pre-Post exercise	NF = ↑ 0,12 microg.L [#]	Water ingestion protects BBB during exercise in warm environment
08	Stalnacke et al. 2006	44W soccer players	Competitive soccer game	Soccer match (involving jumps/collisions/falls/heading)	S100B NSE	Before and After game	↑0,07 µg/l* [#] ↑NSE 1,09 µg/l* [#]	Results significantly related to the number of headers and other trauma events
09	Zetterberg et al. 2007	23M amateur soccer players	Head a ball kicked from 30m at least and 10m forward	10 persons performed 10 and 13 players performed 20 approved headings	CSF: T- Tau; GFAP; S100B; Albumin; Serum: S100B; Albumin	7-10 day after headings	↔ Between groups	Heading in soccer are not associated with any neurochemical signs of injury to the brain
10	Schulpis et al. 2007	10M	Session of Forced Basketball Training – with and without Supplementation (30days)	Normal temperature environment – Supplementation with a-Tocopherol	S100B	Pre-Post training session (with and without suppl)	↑0,17 µg/l after exercise without Suppl [#]	Increase in S100B possibly due to their muscle contractions and lipolysis during the game
11	Stalnacke e Sojka, 2008	19M soccer players	Head a soccer ball falling from 18m (5 headers)	Heading a soccer ball	S100B	Before and After (30min, 2h, 4h post)	↔ compared before and after heading	That impact was not sufficient to cause biochemically discernible damage of brain tissue
12	Straume-Naesheim et al. 2008	535M soccer players	4 groups: Head Impact; High-Intensity exercise; Heading; Match Control		S100B	Pre (baseline) and Post (1h and 12h post a match or training session)	Transient ↑ in both (football training and match)	Results shows a transient increase in S100B. There is a possible additive effect of activity with high intensity and heading, but minor

								head impacts do not seem to cause an additional increase
13	Cheuvront et al. (2008)	9M	100 min of treadmill walking (1.56 m/s, 4% grade)	10 consecutive days of heat acclimation (45°C / 20% humidity)	S100B	Pre, Post	↔S100B between pre-post exercise; ↔S100B between day 1 and 10	Exercise-heat stress had no effect on serum S-100B concentrations before or after 10 days of heat acclimation
14	Andersson et al. 2009	8M and 1W breath-hold divers	Static Apnea (mean time 335s)	Protocol was conducted in dry conditions	S100B	Before, during and after end of apnea (5, 10, 15, 30, 60, 120 min)	↑0,017 µg/l	Apnea affects the integrity of the CNS and do not preclude cumulative effects
15	Stocchero et al. 2010	13M (triathletes)	40min at VT – in bicycle and treadmill	Normal conditions	S100B	Pre and Post	↑ 0,004 [#] µg/l treadmill ↔ in bicycle	Run presents higher muscle damage and promoted an increase in serum S100B levels
16	Bailey et al. 2011	8M	Cycle at 35W for 5 min and increased by 35Wmin until exhaustion	Normal environment	NSE S100B	Pre-Post exercise	↔ [#] ; ↑ 46,6 ng/L ^{-1#}	Intense exercise has the potential to increase BBB permeability without causing structural brain damage
17	Schulte et al. 2011	12M	Cycle at 100W and elevated by 50W every 5min until exhaustion	With (V) and Without (NV) vibration – 4mm and frequency 20hz	S100B	Pre-Post (0, 30, 60, 240 min)	↔S100B after exercise V or NV	Cycling With and Without vibration do not affect BBB
18	Graham et al. 2011	16M amateur boxers	5 minutes in two contests (PTH = punches in head / PTB = punches in body)		S100B NSE CK	Pre, Post	↑S100B, NSE in PTH. ↑CK in both groups	Significant ↑brain-damage biomarkers only in boxers who received direct blows to the head
19	Stavrinou et al. 2011	5M divers	3 consecutive dives – depth 15m; 56min – 12h interval between each session	Conservative recreational diving	S100B	Before and After (each diving and between 3 consecutive dives)	↔ S100B after each dive; ↔ S100B after 3	Diving does not seem to have a discernible and/or cumulative impact on CNS integrity

						consecutive diving	
20	Neselius et al. 2012	30M boxers	S100B NFL GFAP T-tau	After a bout: 1 6 14 days after		↑NFL, GFAP, S100B after boxing; NFL and GFAP remained ↑ after the rest period	Results compared against control group

Values in results represented in Mean Level

Difference between pre and post trial

* Significantly difference

M: men

W: women

Suppl: supplementation

NSE: neuron specific enolase

NFL: neurofilament light protein

GFAP: glial fibrillary acidic protein

CSF: cerebrospinal fluid

CNS: central nervous system

References

- Paulson, O.B. (2002). Blood-brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow. *European Neuropsychopharmacology*; **12**: 495–501
- Liebner, S. Czupalla, C. Wolburg, H. (2011). Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol.* **55**: 467-476
- Biron, K. Dickstein, D. Gopaul, R. Jefferies, W. (2011). Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood-brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's Disease. *PloS One.* **6**(8):e23789
- Starr, J. Farrall, A. Armitage, P. McGum, B. Wardlaw, J. (2009). Blood-brain barrier permeability in Alzheimer's disease: a case-control MRI study. *Psychiatry Research: Neuroimaging.* **171**: 232-241
- Cioni, C. Turlizzi, E. Zanelli, U. Oliveri, G. Annunziata, P. (2012) Expression of tight junction and drug efflux transporter proteins in an *in vivo* model of human blood-brain barrier. *Frontiers in Psychiatry.* **3 – 47**: 1-8
- Feng, S. Cen, J. Huang, Y. Shen, H. Yao, L. Wang, Y. Chen, Z. (2011). Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Secreted by Leukemic Cells Increase the Permeability of Blood-Brain Barrier by Disrupting Tight Junction Proteins. *PLoS ONE* **6**(8): e20599. doi:10.1371/journal.pone.0020599
- Zlokovic, B.V. (2008) The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron.* **57**(2): 178-201
- Jeynes, B. and Provias, J. (2011). The Case for Blood–Brain Barrier Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience Research.* **89**: 22-28
- Desai, B.S. Monahan, A.J. Carvey, P.M. Hendey, B. (2007). Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplant*; **16**(3):285-99
- Garbuzova-Davis, S. Rodrigues, M.C.O. Hernandez-Ontiveros, D.G. et al. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis: A neurovascular disease. *Brain Research.* **1398**: 113-125
- Weissberg, I. Reichert, A. Heinemann, U. et al. (2011). Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis of the Temporal Lobe. *Epilepsy Research and Treatment.* 2011- Article ID 143908 – 10p
- Friedman, A. and Heineman, U. (2012). Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.* [Internet] Forth Edition. 1-12.
- Freeman, L.R. and Keller, J.N. (2012). Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood–brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochimica et Biophysica Acta*; **1822** (5): 822-829

Neselius S, Brisby H, Theodorsson A, Blennow K, Zetterberg H, et al. (2012) CSF-Biomarkers in Olympic Boxing: Diagnosis and Effects of Repetitive Head Trauma. *PLoS ONE* 7(4): e33606. doi:10.1371/journal.pone.0033606

Chodobski, A. Zink, B. Szmydynger-Chodobska, J. (2011) Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res.* **2** (4): 492-516

Kaste M, Kuurne T, Vilkki J, et al. Is chronic brain damage in boxing a hazard of the past? *Lancet* 1982; II (8309): 1186-8

Mussack, T. Dvorak, J. Graf-Baumann, T. Jochum, M. (2003). Serum S100B protein levels in young amateur soccer players after controlled heading and normal exercise. *Eur J Med Res.* **8** (10): 457-64

Stalnacke, B. and Sojka, P. (2008). Repeatedly Heading a Soccer Ball Does Not Increase Serum Levels of S-100B, a Biochemical Marker of Brain Tissue Damage: an Experimental Study. *Biomarker Insights.* **3**: 87-91

Graham, M.R. Myers, T. Evans, P. Davies, B. Cooper, S.M. Bhattacharya, K. Grace, F.M. Baker, J.S. (2011). Direct hits to the head during amateur boxing is associated with a rise in serum biomarkers for brain injury. *Int J Immunopathol Pharmacol.* **24**(1): 119-25

McCrory, P. Zazryn, T. Cameron, P. (2007). The Evidence for Chronic Traumatic Encephalopathy in Boxing. *Sports Med;* **37**(6):467-476

Archer, T. (2012). Influence of physical exercise on traumatic brain injury deficits: scaffolding effect. *Neurotoxicity research*, 21(4), pp.418–34.

Otto, M. Holthusen, S. Bahn, E. Söhnchen, N. Wiltfang, J. Geese, R. Fischer, A. Reimers, C.D. (2000) Boxing and running lead to a rise in serum levels of S-100B protein. *Int J Sports Med.* Nov; 21(8):551-5

Stalnacke, B. Ohlsson, A. Tegner, Y. Sojka, P. (2006). Serum concentrations of two biochemical markers of brain tissue damage S-100B and neurone specific enolase are increased in elite female soccer players after a competitive game. *Br J Sports Med;* **40**:313–316

Hasselblatt M, Mooren FC, von Ahsen N, Keyvani K, Fromme A, Schwarze-Eicker K, Senner V, Paulus W. (2004). Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. *Neurology.* 2004 May 11;62(9):1634-6

Schulte, S. Schiffer, T. Sperlich, B. Kleinoder, H. Holmberg, H.C. (2011). Serum Concentrations of S100B are not Affected by Cycling to Exhaustion With or Without Vibration. *Journal of Human Kinetics.* **30**: 59-63

Bailey, D.M. Evans, K.A. McEnemy, J. et al. (2011) Exercise-induced oxidative-nitrosative stress is associated with impaired dynamic cerebral autoregulation and blood-brain barrier leakage. *Experimental Physiology, November 1, 96,* 1196-1207

Stalnacke, B. M., Y. Tegner, et al. (2003). "Playing ice hockey and basketball increases serum levels of S-100B in elite players: a pilot study." *Clin J Sport Med* 13(5): 292-302.

Dietrich, M.O.; Tort, A.B.; Schaf, D.V.; Farina, M.; Goncalves, C.A.; Souza, D.O.; and Portela, L.V. (2003). Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can. J. Appl. Physiol.* 28(5): 710-716.

Marchi, N. Rasmussen, P. Kapural, M. (2003). Peripheral markers of brain damage and blood-brain barrier dysfunction. *Restorative Neurology and Neuroscience.* 21: 109-121

Bulut, M. Koksall, O. Dogan, S. et al. (2006). Tau Protein As a Serum Marker of Brain Damage in Mild Traumatic Brain Injury: Preliminary Results. *Advances in Therapy;* 23(1)

Blyth, B.J. Farhavar, A. Gee, C. Hawthorn, B. He, Hua. Nayak, A. Stöcklein, V. Bazarian, J.J. (2009). Validation of Serum Markers for Blood-Brain Barrier Disruption in Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma,* 26:1497-1507

Ingebrigtsen, T. Romner, B. (2003). Biochemical serum markers for brain damage: a short review with emphasis on clinical utility in mild head injury. *Restorative Neurology and Neuroscience.* 21: 171-176

Gonçalves, C.A. Leite, M.C. Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem.* 41: 755–763.

Pham, N. et al., 2010. Extracranial sources of S100B do not affect serum levels. *PloS one,* 5(9).

Andersson, J.P. a, Linér, M.H. & Jönsson, H., 2009. Increased serum levels of the brain damage marker S100B after apnea in trained breath-hold divers: a study including respiratory and cardiovascular observations. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985),* 107(3), pp.809–15.

Maughan, R.J., Shirreffs, S.M. & Watson, P., 2007. Exercise , Heat , Hydration and the Brain. *Nutrition,* 26(5):604-612

Meeusen, R. Watson, P. Hasegawa, H. Roelands, B. Piacentini, M. (2006). Central Fatigue The Serotonin Hypothesis and Beyond. *Sports Med.* 36 (10): 881-909

Vajtr D, Benada O, Kukacka J, Průsa R, Houstava L, Toupalík P, et al. (2009). Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Physiol Res;* 58: 263-268.

Yan, H. Zhang, H. Wu, Q. et al. (2012). Increased leakage of brain antigens after traumatic brain injury and effect of immune tolerance induced by cells on traumatic brain injury. *Chin Med J.* 125(9): 1618-1626

Moser, R. Iverson, G. Echemendia, R. et al. (2007). Neuropsychological evaluation in the diagnosis and management of sports-related concussion: Position Stand. *Archives of Clinical Neurophysiology.* 22 (8): 909-16

- Van Assema, D., Lubberink, M., Boellaard, R. et al. (2012). P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier: Effects of Age and Gender. *Mol Imaging Biol.* DOI: 10.1007/s11307-012-0556-0
- Portela, L.V., Tort, A.B. et al. (2002). The serum S100B concentrations is age dependent. *Clin Chem.* **48** (6 pt 1): 950-2
- Cheuvront, S. N., T. D. Chenevère, B. R. Ely, R. W. Kenefick, D. A. Goodman, J. P. McClung, And M. N. Sawka. (2008). Serum S-100B Response to Exercise-Heat Strain before and after Acclimation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **40** (8):1477-1482
- Stalnacke, B. M., Y. Tegner, et al. (2003). "Playing ice hockey and basketball increases serum levels of S-100B in elite players: a pilot study." *Clin J Sport Med* **13**(5): 292-302
- Barth, J. T., Freeman, J. R., Broshek, D. K., Varney, R. N. (2001). Acceleration-deceleration sport-related concussion: The gravity of it all. *Journal of Athletic Training.* **36** (3):253-256.
- Straume-Naesheim, T. M., T. E. Andersen, et al. (2008). "Minor head trauma in soccer and serum levels of S100B." *Neurosurgery* 62(6): 1297-305; discussion 1305-6
- Tomkins, O., Feintuch, A., Benifla, M. et al. (2011). Blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury: a possible role in posttraumatic epilepsy. *Cardiovascular psychiatry and neurology*, 2011, p.765923
- Lars Nybo (2012) Brain temperature and exercise performance. *Exp Physiol* 97.3 (2012) pp 333–339
- González-Alonso, J. (2007) Hyperthermia Impairs Brain, Heart and Muscle Function in Exercising Humans. *Sports Med.* **37** (4-5): 371-3
- Nielsen, B. and Nybo, L. (2003). Cerebral changes during exercise in the heat. *Sports Med.* **33**(1): 1-11
- Watson, P., Shirreffs, S.M., Maughan, R.J. (2005) Blood-brain barrier integrity may be threatened by exercise in a warm environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1689–R1694
- Sharma, H. (2005). Heat-related deaths are largely due to brain damage. *Indian J Med Res.* **121**: 621-623
- Sharma, H.S. and Hoopes, P.J. (2003). Hyperthermia induced pathophysiology of the central nervous system. *International journal of hyperthermia.* **19** (3):325–54
- Skowrońska, M. and Albrecht, J. (2012). Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotoxicity research*, 21(2):236-44
- Stolp, H.B. and Dziegielewska, K.M. (2009) Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathology and applied neurobiology*, **35**(2):132-46

Watson, P. Black, K.E. Clark, S.C. Maughan, R.J. (2006). Exercise in the heat: effect of fluid ingestion on blood-brain barrier permeability. *Med Sci Sports Exerc.* **38**(12): 2118-24

Maughan, R.J. (2010) Distance running in hot environments: a thermal challenge to the elite runner. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 20 (Suppl 3):95-102

Jeliazkova-Mecheva, V.V. et al. (2006). Brief heat shock affects the permeability and thermotolerance of an in vitro blood-brain barrier model of porcine brain microvascular endothelial cells. *Microvascular research*, **71**(2):108-14

Stavrinou, L.C. Kalamatianos, T. Stavrinou, P. Papasilekas, T. Psachoulia, C. Tzavara, C. Stranjalis, G. (2011). Serum levels of S-100B after recreational scuba diving. *Int J Sports Med.* **32**(12):912-5

Azmitia, E.C., Griffin, W.S., Marshak, D.R., Van Eldik, L.J., and Whitaker-Azmitia, P.M. (1992). S100 beta and serotonin: A possible astrocytic-neuronal link to neuropathology of Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 94: 459-473.

Haring, J.H., Hagan, A., Olson, J., and Rodgers, B. (1993). Hippocampal serotonin levels influence the expression of S100 beta detected by immunocytochemistry. *Brain Res.* 631: 119-123

Eriksen, J.L., Gillespie, R., and Druse, M.J. (2002). Effects of ethanol and 5-HT(1A) agonists on astroglial S100B. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 139(2): 97-105

Kaur, C. and Ling, E.A. (2008). Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res* **5**:71-81

Wong, C.H.Y. & Crack, P.J. (2008). Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury. *Current medicinal chemistry*, 15(1):1-14

Pun, P.B.L. Lu, J. Mochhala, S. (2009) Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free radical research*, **43**(4):348-64

Lochhead, J.J McCaffrey, G. Quigley, C.E. Finch, J. DeMarco, K.M. Nametz, N. Davis, T.P. (2010). Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occluding during hypoxia-reoxygenation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*; 30: 1625-1636

Fisher-Wellman, K. Bloomer, R.J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*; 8:1

Gonçalves, C.A. Leite, M.C. Guerra, M.C. (2010). Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovascular psychiatry and neurology*; p.790431

Abbott. N.J. Patabendige, A.A.K. Dolman, D.E.M. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1):13-25

- Shlosberg, D. Benifla, M. Kaufer, D. Friedman, A. (2010) Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. **6**(7):393-403.
- Rosén, H. Karlsson, J.E. Rosengren, L. (2004). CSF levels of neurofilament is a valuable predictor of long-term outcome after cardiac arrest. *Journal of the Neurological Sciences*. **221**: 19-24
- Kiyatkin, E.A. and Sharma, H.S. (2009). Permeability of the Blood-Brain Barrier depends on Brain Temperature. *Neuroscience*, **161**(3): 926-939.
- Nybo, L. Dalsgaard, M.K. Steensberg, A. et al. (2005) Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. *J Physiol*; **563**(1): 285-290
- Cauli, O. López-Larrubia, P. Rodrigo, R. et al. (2011) Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology*. **140**: 638-645
- Nguyen, J.H. Yamamoto, S. Steers, J. et al. (2006) Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol*; **44**: 1105-1114
- Woertgen, C. Rothoerl, R.D. Sauer, K. et al. (2002). Does bungee jumping release S-100B protein? *Journal of Clinical Neuroscience*; **9**(1): 51-52
- Stocchero, C.M.A. Oses, J. P. Martins, J. et al. (2010a). Serum S100B levels in triathletes after different types of exercise. In: American College of Sports Medicine Annual Meeting, 2010, Baltimore, USA. *Medicine and Science in Sports and Exercise*; **42**: S554-S554
- Stocchero, C.M.A. Muller, A.P. Oliveira, A.R. Portela, L. V. (2010b). A Proteína S100B e o exercício físico. *Rev Bras de Cineantropometria & Desempenho Hum*; **12**: 77-81
- Van Assema, D. Lubberink, M. Boellaard, R. et al. (2012). P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier: Effects of Age and Gender. *Mol Imaging Biol*. DOI: 10.1007/s11307-012-0556-0
- Barth, J. T. Freeman, J. R. Broshek, D. K. Varney, R. N. (2001). Acceleration-deceleration sport-related concussion: The gravity of it all. *Journal of Athletic Training*. **36** (3):253-256
- Vajtr, D. Benada, O. Kukacka, J. et al. (2009). Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Physiol Res*; **58**: 263-268
- Goncalves, C.A. Leite, M.C. Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*. **41**: 755–763.
- Bulut, M. Koksal, O. Dogan, S. et al. (2006). Tau Protein As a Serum Marker of Brain Damage in Mild Traumatic Brain Injury: Preliminary Results. *Advances in Therapy*; **23**(1)12-22
- Gysland, S.M. Mihalik, J.P. Register-Mihalik, J.K. et al. (2012) The Relationship Between Subconcussive Impacts and Concussion History on Clinical Measures of Neurologic Function in Collegiate Football Players. *Annals of Biomedical Engineering*; **40**(1)14-22

Rogers, C.J. Colbert, L.H. Greiner, J.W. et al. (2008) Physical Activity and Cancer Prevention. Pathways and Targets for Intervention. *Sports Med*; **38**(4): 271-296

Griesbach, G.S. (2011). Exercise After Traumatic Brain Injury: Is it a Double-Edged Sword? *PM&R: the journal of injury, function, and rehabilitation*. **3**(6-suppl 1): S64-S72

Snow R, Carey M, Stathis C, Febbraio M & Hargreaves M (2000). Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. *J Appl Physiol*. **88**:1576-1580

Jalan, R. Olde Damink, S.W. Hayes, P.C. Seutz, N.E. Lee, A. (2004). Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol*; **41**:613-620

Jalan, R. Bernuau, J. (2007) Induction of cerebral hyperemia by ammonia plus endotoxin: Does hyperammonemia unlock the blood–brain barrier? *Journal of Hepatology*; **47**:168-171

Pedersen, H.R. Ring-Larsen, H. Olsen, N.V. Larsen, F.S. (2007). Hyperammonemia acts synergistically with lipopolysaccharide in inducing changes in cerebral hemodynamics in rats anaesthetised with pentobarbital. *J Hepatol*; **47**:245-252