

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DE BIOMARCADORES NÃO CONVENCIONAIS E
CONVENCIONAIS NOS MEDALISTAS OLÍMPICOS DE VÔLEI DE
PRAIA DURANTE AS TEMPORADAS PRÉ-OLÍMPICA E OLÍMPICA**

HELVIO DE OLIVEIRA AFFONSO

VILA VELHA-ES
MAIO/2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DE BIOMARCADORES NÃO CONVENCIONAIS E
CONVENCIONAIS NOS MEDALISTAS OLÍMPICOS DE VÔLEI DE
PRAIA DURANTE AS TEMPORADAS PRÉ-OLÍMPICA E OLÍMPICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

HELVIO DE OLIVEIRA AFFONSO

VILA VELHA-ES
MAIO/2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

A256e Affonso, Helvio de Oliveira.
Estudo de biomarcadores não convencionais e convencionais nos medalistas olímpicos de vôlei de praia durante as temporadas pré-olímpica e olímpica. / Helvio de Oliveira Affonso – 2017.
84 f.: il.

Orientador: Thiago de Melo C. Pereira.
Coorientadora: Bianca P. Campagnaro.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Stress oxidativo.
I. Pereira, Thiago de Melo C. II. Campagnaro, Bianca P.
III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

HELVIO DE OLIVEIRA AFFONSO

ESTUDO DE BIOMARCADORES NÃO CONVENCIONAIS E CONVENCIONAIS NOS MEDALISTAS OLÍMPICOS DE VÔLEI DE PRAIA DURANTE AS TEMPORADAS PRÉ-OLÍMPICA E OLÍMPICA

Dissertação apresentada a
Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de
Pós-Graduação em ciências
Farmacêuticas, para a obtenção
grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovado em 31 de maio de 2017.

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Marcella Leite Porto (IFES)



Prof. Dr. Miguel Ângelo Alves dos Santos (UVV)



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira (UVV)
Orientador

DEDICATÓRIA

À mulher da minha vida, Roberta, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente a partir do nascimento de nossa filha Aylla, onde o tempo ficou desafiador para nós e eu precisei estar mais ausente por conta das aulas e coleta de dados desta pesquisa.

Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Aos meus pais Gilson e Nair (in memoriam), que dignamente sempre me mostraram à importância da família e me direcionaram para o caminho da honestidade e persistência.

A minha filha Aylla que preenche meu coração de alegria e amor todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. Thiago de Melo Costa Pereira, por ser uma pessoa que inspira pelo exemplo e simplicidade nas ações. Sou extremamente agradecido por tê-lo como meu orientador, principalmente por me fazer sentir desafiado e motivado em áreas que nunca pensei em aprofundar meus conhecimentos como educador físico;

Ao professor Vasquez que me motivou e incentivou a continuar mesmo quando ainda incipiente na coleta de dados e direcionamento da pesquisa.

Aos amigos da Appto, Angelo e Thierry, por serem parceiros e me permitirem fazer a pesquisa mesmo as vezes tendo que substituir minha presença em alguns eventos ou ações da empresa.

Ao COB – Comitê Olímpico Brasileiro pelo suporte e possibilidade de desenvolver um trabalho de tal magnitude com atletas de tão expressivo quilate.

À minha família, em especial a minha esposa Roberta, por todo apoio, carinho e amor.

Aos atletas e staff da equipe que sempre me acolheram e auxiliaram dentro de um universo novo para eles, o universo acadêmico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Apresentação de diferentes níveis de planificação	18
Tabela 2. Adaptações neurais, metabólicas, morfológicas e enzimáticas	19
Tabela 3. Adaptações e velocidade	20
Tabela 4. Adaptações de resistência aeróbica e anaeróbica	20
Tabela 5. Concorrências em treinamentos combinados	21
Tabela 6. Tabela adaptada Hormônios e exercício	22
Tabela 7. Características antropométricas dos jogadores de elite de VP	41
Tabela 8. Evolução dos biomarcadores convencionais	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Periodização de treinamento	17
Figura 2. Produção de ROS pelo músculo aumenta durante a fadiga	31
Figura 3. Produção de Força Isométrica x estresse Oxidativo	32
Figura 4. Força e potência perfis avaliados em medalhistas de ouro RJ 2016	42
Figura 5. Evolução de marcadores não convencionais	43
Figura 6. Medição de marcadores convencionais	45

LISTA DE ABREVIATURAS

•O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
GGT	Gama Glutamil Transferase
Ca ⁺⁺	Cálcio
CHCM	Concentração média de hemoglobina
CK	Creatina Quinase
CK-MB	Isoforma/isoenzima MB da Creatina Quinase
COB	Comitê Olímpico Brasileiro
CT	Colesterol total
DCF	Diclorofluoresceína
DHE	Dihidroetídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido
Fe ⁺⁺	Ferro
FSH	Hormônio foliculotrófico ou folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HCM	Teor médio de hemoglobina
HDL	Colesterol de alta densidade
HOMA IR	Índice para avaliar a resistência a insulina
HPF	Hidroxifenilfluoresceína
Ht	Hematócrito
IGF-1	Fator de crescimento insulina- <i>like</i>
IGF-1/cortisol	Razão fator de crescimento insulina e cortisol
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IFES	Instituto Federal do Espírito Santo
K ⁺	Potássio
KGF	Quilogramas-força
LDH	Lactato Desidrogenase
LH	Hormônio luteinizante

MDA	Malondialdeído
Mg ⁺⁺	Magnésio
Na ⁺	Sódio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Proteína C Reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RBC	Contagem de células vermelhas no sangue
RJ 2016	Jogos Olímpicos do Brasil - Rio de Janeiro 2016
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotações por Minuto
SFB	Soro fetal bovino
T/C	Razão Testosterona/Cortisol
T4	Tiroxina livre
TG	Triglicerídeo
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UVV	Universidade Vila Velha
RDW	Red Cell Distribution Width
VCM	Volume corpuscular médio
VP	Vôlei de Praia
W	Watts
W/KG	Razão de watts por peso corporal

RESUMO

AFFONSO, Helvio de O. Universidade Vila Velha - ES, maio de 2017. **Estudo de Biomarcadores não convencionais e convencionais nos Medalistas Olímpicos de Vôlei de Praia durante as temporadas Pré-Olímpica e Olímpica.** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira. Coorientadora: Bianca Prandi Campagnaro.

Os biomarcadores são definidos como alterações bioquímicas ou celulares frequentemente quantificadas em fluidos. Embora várias biomoléculas ofereçam uma abordagem dinâmica ao diagnóstico, prognóstico e triagem de várias doenças, apenas nas últimas décadas alguns biomarcadores emergiram como ferramenta interessante no esporte, havendo ainda uma lacuna para os atletas de elite de vôlei de praia (VP). Como os valores de referência desses atletas ainda são desconhecidos, esses parâmetros podem contribuir parcialmente para minimizar interpretações errôneas e decisões inadequadas pela medicina esportiva. Torna-se interessante conhecer o perfil desses biomarcadores para otimizar o processo de treinamento. Avaliamos os níveis de biomarcadores não convencionais e convencionais em atletas de elite VP durante anos pré-olímpicos e olímpicos. Este estudo prospectivo observacional incluiu 2 atletas olímpicos de VP adultos durante as temporadas 2015 e 2016, divididas em três blocos: A) adaptação geral ou introdutória (ênfase treinamento resistência); B) acúmulo de força e transição de força/potência e C) Potência (períodos-alvo competitivos - competições mais importantes). Ao longo da periodização de treinamento, força e potência foram monitoradas por dinamometria digital computadorizada. Adicionalmente, foram colhidas amostras de sangue entre as 48 horas pós-jogos ou pós-bloco. Por fim, foram analisados os biomarcadores não convencionais (produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em leucócitos e apoptose/índice de necrose) além de 48 biomarcadores convencionais. Os valores de ROS aumentaram em períodos de intensa atividade de exercícios (períodos de "acumulação" e "competição") em comparação com os períodos de "adaptação geral ou introdutório". No entanto, entre todos os biomarcadores convencionais, apenas a CK apresentou valores acima de referência normal, principalmente em períodos de atividade física intensa. Em relação ao metabolismo anabólico/metabólico, a relação IGF-1/Cortisol apresentou melhor perfil que a relação Testosterona/Cortisol dos atletas VP. Concluímos que ROS associados à relação IGF-1/cortisol podem ser biomarcadores sensíveis durante as periodizações de VP para acompanhar a performance dos jogadores em substituição a biomarcadores convencionais. Esses parâmetros podem ajudar a prevenir possíveis estados de *overtraining* e lesões, abrindo uma nova via para otimizar o monitoramento de desempenho dos atletas de elite VP.

Palavras-chave: biomarcador, estresse oxidativo, ROS, *overtraining*

ABSTRACT

AFFONSO, Helvio de O., Universidade Vila Velha - ES, maio de 2017. **Non-conventional and conventional biomarkers evaluated in gold medalists beach volleyball players during the 2015 and 2016 seasons (pre-Olympic and Olympic years)**, Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira. Coorientadora: Bianca Prandi Campagnaro.

The biomarkers can be defined as biochemical or cellular alterations which are frequently quantified in fluids, such as blood serum, urine or saliva [Hulka, 1990; Mayeux, 2004]. Although biomolecules are fundamental to diagnosis, prognosis and screening of several diseases, only in the last decades some biomarkers have emerged a tool in elite sports, there is still a void in elite beach volleyball (BV) athletes. As the reference values for serum biomarkers of elite BV athletes is still unknown, these parameters may partially contribute to misinterpretation culminating with inadequate decisions by the staffs, as observed in other modalities. Then, it is interesting to know the profile of biomarkers of elite BV athletes to optimize the periodization process and performance of athletes. To evaluate the levels of non-conventional and conventional biomarkers in elite BV athletes during the pre-Olympic and Olympic years. This prospective and observational study included 2 Olympic adult beach volleyball players during 2015 and 2016 seasons which were divided into three blocks: A) general or introductory adaptation (under endurance training); B) accumulation of force and transition of force/power (under strength training) and C) power (competitive target periods - most important competitions). Along the seasons, strength and power were monitored by a computerized digital dynamometer. In addition, blood samples were collected between at 48h post-match or post-block. Finally, the non-conventional (leukocyte ROS production and apoptosis/necrosis index) and conventional biomarkers (48 parameters) were analyzed. Both serum leukocyte ROS and apoptosis/necrosis index of BV athletes increased in periods of intense exercise activity ('accumulation' and 'competition' periods) compared with 'restitution' or 'pre-season' periods. However, among all the conventional biomarkers, only CK showed values above the normal reference mainly in periods of intense exercise activity. In relation to anabolic/metabolic metabolism, IGF-1/Cortisol ratio showed better profile than Testosterone/Cortisol ratio of BV athletes. Our findings suggest that non-conventional markers (leukocyte ROS production and apoptosis/necrosis) associated to IGF-1/cortisol ratio could be sensitive biomarkers during the BV seasons to follow the performance of the players in substitution to conventional serum biomarkers. These parameters may help prevent possible states of overtraining and injuries, opening a new avenue for optimizing the performance monitoring of elite BV athletes.

Keywords: *biomarker, estresse oxidativo, ROS, overtraining*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	HISTÓRICO DA PERIODIZAÇÃO DE TREINAMENTO	16
2.2	TIPOS DE PERIODIZAÇÃO DE TREINAMENTO	17
2.3	MECANISMOS DE FADIGA	18
2.4	CAPACIDADES/VALÊNCIAS FÍSICAS	20
2.5	SISTEMA ENDÓCRINO, CARGAS DE TREINO, ADAPTAÇÕES	21
2.6	SISTEMA IMUNE E ADAPTAÇÕES DE TREINAMENTOS	23
2.7	OS BIOMARCADORES	24
2.8	A IMPORTÂNCIA DO MONITORAMENTO	26
2.9	A FORÇA/POTÊNCIA E A PRODUÇÃO DE ROS	31
2.10	JUSTIFICATIVA	33
2.11	OBJETIVO GERAL	33
2.12	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3.	METODOLOGIA	34
3.1	SUJEITOS	34
3.2	PERIODIZAÇÃO DO TREINAMENTO	34
3.3	EVOLUÇÃO DA FORÇA E POTÊNCIA	34
3.3.1	TESTE DE 1 RM – REPETIÇÃO MÁXIMA	35
3.3.2	TESTE DE POTÊNCIA	35
3.4	AMOSTRA DE SANGUE	35
3.5	ANÁLISE DE MARCADORES SANGUÍNEOS	36
3.6	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO	36
3.7	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E APOPTOSE (ANEXINA)	37
3.8	MEDIDA DE ESTRESSE OXIDATIVO PELA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	38

3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4.	RESULTADOS	41
4.1	SUJEITOS, CARACTERÍSTICAS GERAIS	41
4.2	MEDIÇÕES DAS CARGAS DE TREINAMENTO	41
4.3	BIOMARCADORES NÃO CONVENCIONAIS: MEDIÇÕES DE ROS E APOPTOSE	43
4.4	EVOLUÇÃO DE MARCADORES CONVENCIONAIS	44
5.	DISCUSSÃO	46
6.	CONCLUSÃO	50
7.	REFERÊNCIAS	51
8.	ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

No desporto de alta *performance*, é de fundamental importância que os atletas apresentem alto desempenho físico, motor, cognitivo e afetivo durante as competições ou por um período competitivo [Lopes, 2005], independentemente do desporto ou modalidade. Após o início da carreira profissional, depois de vencidas as etapas de iniciação, adaptação e aprendizagem nas categorias de base da modalidade esportiva escolhida, é necessário que o indivíduo supere uma exaustiva rotina de treinamentos físicos, técnicos, táticos e até psicológicos, e a partir daí, convencionalmente, os resultados apareçam em média após 10.000 horas ou pelo menos 5 anos consecutivos de treinamentos[Crítica, 2011].

A melhora da *performance* esportiva depende não somente da otimização de distribuição das cargas de treinamento, mas também da recuperação prescrita aos atletas. O monitoramento da preparação atlética facilita a avaliação e adaptação das práticas visando otimizar os resultados de desempenho [Ackerman, Clifford, McNaughton and Bentley 2015], portanto, controlar estas variáveis se faz necessário para a prevenção de efeitos negativos, como por exemplo, a queda no rendimento e doenças resultantes pelo *Overtraining* [Carfagno E Hendrix, 2014; Impellizzeri et Al., 2004; Alexiou; Coutts, 2008; Wallace; Slattery; Coutts, 2008; Borresen; Lambert, 2010, 2009]. Dessa forma, o treinamento esportivo é uma atividade sistemática que não deve somente promover as adaptações morfo-funcionais responsáveis pelo aumento do desempenho atlético [Virus, 1995; Virus & Virus,2000], mas também respeitar as condições idiossincráticas do atleta.

Atualmente, as capacidades biomotoras são majoritariamente monitoradas através de protocolos de testes específicos como: Força (salto horizontal e vertical, lançamento e potência); velocidade (velocidade de deslocamento máximo e lateral); resistência (membros superiores e inferiores), testes de habilidade técnica (arremesso, passe e recepção) [Moura,2007; Moreira et Al., 2010]. Excetuando a avaliação psicológica, as avaliações físicas são realizadas atualmente com o auxílio de células fotoelétricas, plataformas de salto, plataformas de força, acelerômetros, dinamômetros, eletroneuromiografias e células de carga (fundamentais para análise de força muscular em condições isométricas), até mesmo para desportos de alto rendimento, incluindo seleções brasileiras de várias modalidades. Apenas para

apenas alguns grupos de atletas em centros avançados de pesquisa, de uma forma mais invasiva, podemos ainda citar, as biópsias musculares ou as verificações das adaptações relacionadas ao funcionamento do metabolismo aeróbio com biogênese mitocondrial, vascularização e/ou mudança no fenótipo da fibra [Roschel et al., 2011].

Ainda disponível para pouquíssimos atletas, podemos ressaltar o trabalho desenvolvido pelo professor Luiz Claudio Cameron (COB – Comitê Olímpico Brasileiro) analisando o metaboloma, ou seja, o perfil metabólico dos atletas selecionados pelo próprio comitê. Essa análise metabolômica oferece informações acerca das respostas dos mecanismos bioquímicos e biológicos do metabolismo, seja alteração por estresse ambiental, patológica, genético ou em resposta ao estresse causado pelo exercício físico [Resende 2010].

Um comportamento questionável desses monitoramentos de atletas é que a mesma carga externa de treinamento (CET) utilizada durante uma sessão pode gerar adaptações ou respostas, cargas internas de treinamento (CIT) diferenciadas para cada um dos atletas da mesma equipe, podendo assim comprometer o rendimento final de cada indivíduo [C. Outts e Cormack 2014]. Na verdade, tal conduta é bastante difundida entre os treinadores justificada pela dificuldade de controlar o verdadeiro efeito da carga de treinamento no organismo dos atletas (CIT) fazendo com que muitos treinadores ainda prescrevam os treinamentos de forma apenas intuitiva ao invés de se basearem em um controle mais pormenorizado e menos empírico [Lambert e Borresen, 2010]. Destacamos e indicamos um controle do “preço Fisiológico” (expressão cunhada por nós) pago pelo atleta frente a uma carga de treino, frente a uma sessão, micro, meso ou macro ciclo de treinamentos.

Na intenção de otimizar a avaliação individual dos processos de treinamento e reabilitação dos atletas, surgem as buscas por marcadores sanguíneos. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os níveis de biomarcadores convencionais e não convencionais em atletas de elite de Vôlei de Praia (VP) durante as temporadas de 2015 e 2016 (anos pré-Olímpico e Olímpico). Estes dados podem identificar uma nova abordagem para otimizar o monitoramento de desempenho de atletas de VP.

Esperamos fundamentar os *staffs* com uma maior possibilidade de interpretação analítica das informações sobre os impactos fisiológicos do treinamento esportivo no organismo do atleta (carga interna de treinamento).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - Histórico da periodização de treinamentos

O treinamento desportivo é uma atividade bastante antiga que vem evoluindo de forma significativa nos últimos anos, mais precisamente a partir da era moderna dos Jogos Olímpicos. Desde o Egito e Grécia, já era possível constatar o uso de alguns princípios do treinamento para preparar atletas para os Jogos Olímpicos e para a guerra [Barbanti 1997; Monteiro e Lopes 2015]. No entanto, foi somente no final do século XIX, com o renascimento dos Jogos Olímpicos que o treinamento desportivo passou de uma forma espontânea a uma estrutura mais sistemática, visando elevar o rendimento esportivo [Barbanti, 1997]. Atualmente, é comum se dividir o ano de treinamento em vários períodos e ciclos com o objetivo específico de alcançar rendimento por meio de uma preparação sistemática. Diante da necessidade de se organizar o processo de treinamento em ciclos, fases, períodos, surgiu o termo “periodização”, que significa a divisão da temporada de preparação em períodos e etapas de treino com objetivos, orientações específicas e características particulares (Silva 1998; Gamble, 2006). Segundo a literatura, a primeira fase ou a racionalização do treinamento é creditada a um grupo de Treinadores Gregos pioneiros: Kotov (1916); Gorinevisk (1922); Pihkala (1930); Grantyn (1939); Ozolin (1949); Letunov (1950). Já a segunda fase ou “período dos modelos tradicionais” teve início principalmente na extinta União Soviética (URSS), em meados da década de 50. Embora muitos tenham sido os autores responsáveis pelo avanço teórico da periodização do treinamento físico, um deles foi considerado o idealizador da periodização moderna, Lev Pavlovic Matveev [Manso et al, 1996 e Oliveira, 1998].

Finalmente, a terceira Fase, chamada de “período dos Modelos Contemporâneos”, sendo o idealizador mais proeminente o autor Yuri Verkhoshansky, o qual não se utiliza o termo planificação/periodização, mas sim como um sistema onde se encaixam os conceitos de programação, organização e controle, esta também conhecido como sistema em blocos e, extremamente adotado em programas de Alto Rendimento que apresentem a necessidade de vários “picos” de performance para a mesma temporada (MARINHO, 2008). Outros autores desta época foram: Verkhoshansky (1990); Issurin (1986); Bondarchuck (1984); Bompa (1999), trazendo, portanto uma importante influência ainda nos modelos utilizados atuais de periodização.

2.2 - Tipos de Periodização

Sistema Tradicional de Periodização: Segundo [Garcia, Navarro e Ruiz, 1996], o sistema tradicional originado na década de 50 ainda se mantém utilizado nos dias atuais por um grande número de *staffs*. O sistema originalmente proposto caracteriza-se pela realização de um a dois macrociclos no ano, finalizados por um “pico” de *performance* e “apenas” uma ou duas competições importantes. Os macrociclos são subdivididos em períodos preparatório, competitivo e de transição [Matveev 1997].

Sistemas Contemporâneos de Periodização: Os sistemas contemporâneos propostos a partir dos sistemas tradicionais foram incentivados pela necessidade de progresso dos resultados considerando as particularidades específicas de cada modalidade desportiva. [García, Navarro & Ruiz 1996]. De acordo com Platonov (2005), o aumento excepcional nas cargas de treinamento e a elevação no número de competições com necessidade de êxito em grande parte delas, constituíram fatores determinantes na busca de novos sistemas de treinamento que garantissem a elevação e o prolongamento da forma desportiva do atleta no mais alto nível competitivo. Os sistemas contemporâneos são caracterizados por alguns aspectos particulares como a individualização das cargas de treinamento justificada pela capacidade individual de adaptação do organismo, a concentração de cargas de trabalho de uma única orientação em períodos de curta duração, o desenvolvimento consecutivo de capacidades biomotoras e finalmente pelo incremento do volume do trabalho específico de treinamento [Garcia et. al. 1996; Gomes 2002; Oliveira 1998; Marinho, 2008]. A representação generalizada dos ciclos de programa de treinamento segue ilustrada na figura abaixo:

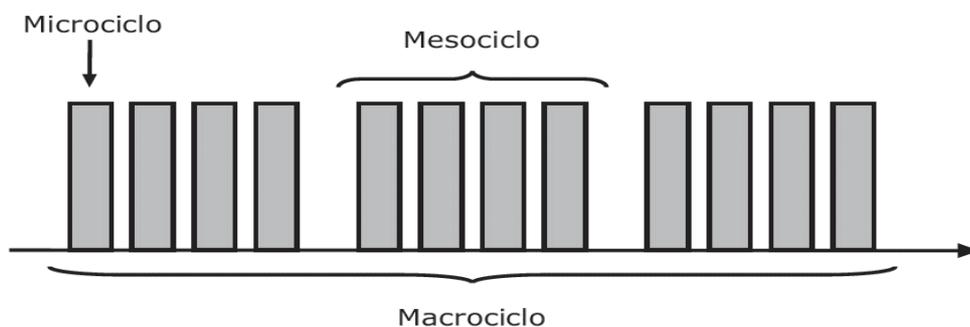


Figura 1 –Periodização de treinamento **Fonte:** Adaptado de Prestes et al., 2010

Em linhas gerais, os microciclos representam semanas, os mesos “meses” e o macro “anos ou semestres”.

Tabela 1. Apresentação de diferentes níveis de planificação [Manso,1996]

Matveev	Sessão	Microciclo	Mesociclo	Fase	Período	Macro ciclo
Weineck	Sessão	Microciclo	Mesociclo	Fase	Período	Ciclo
Bompa	Sessão	Microciclo	Macro ciclo	Subfase	Fase	Mesociclo
Platonov	Sessão	Microciclo	Mesociclo	Etapa	Período	Macro ciclo
Verkhoshanski	Sessão	Microciclo	Bloco	_____	_____	Ciclo

2.3 - Mecanismos de fadiga e adaptações de treinamentos: neurais, metabólicas, enzimáticas e morfológicas

Refletindo para além das adaptações de treinamento, pensando em evitar lesões, riscos de *Overtraining* e doenças, torna-se imprescindível conhecer e monitorar os mecanismos de fadiga durante os treinamentos, este conhecimento deve nortear todo o processo de periodização de treinamento e tomadas de decisão por parte do *staff* que acompanha o atleta [Coutts e Cormack 2014; Halson 2014; Roos et al 2013; Taylor et al 2012]. Destacamos que os principais mecanismos de fadiga em treinamentos de resistência de longa duração [Fox, 1991] são:

- A. Diminuição das reservas energéticas (fosfocreatina, glicogênio)
- B. Baixa eficiência das vias metabólicas aeróbias e anaeróbias do ATP, culminando com:
 - B1. Aumento da concentração intramuscular de ADP pela incapacidade de refosforilação do ADP em ATP
 - B2. Acúmulo de substâncias residuais do metabolismo (íons H⁺, ureia, lactato, potássio)

No esporte de alta *performance*, os atletas invariavelmente devem apresentar alto desempenho físico, motor, cognitivo e afetivo durante a competição “alvo” ou por um período competitivo ou macrociclo de treinamento [Martin, 1977 apud Weineck; Bompa; Garret e Kirkendall, 2003]. Assim, torna-se determinante conhecer as peculiaridades da modalidade a ser trabalhada com o atleta ou praticante, assim como, quais os padrões energéticos, motores, psicológicos entre outros que são

necessários para atender as diferentes demandas. Extrapolando esta ideia, é preciso também ter domínio sob a natureza e dimensão das adaptações (agudas e crônicas) que serão resultantes dos treinamentos de força, velocidade, resistência, flexibilidade e suas formas de manifestação, ao longo do ano [Monteiro e Lopes, 2015].

A prescrição do exercício, de forma intuitiva, dependente exclusivamente da experiência do treinador, até muito recentemente utilizada, representa uma limitação muito grande no que tange ao entendimento e controle da causa e efeito do treinamento [Borressen e Lambert 2010]. Métodos e parâmetros que sejam capazes de controlar as cargas externas e internas de treinamento, que são impostas aos atletas são constantemente alvo de discussões e pesquisas entre treinadores, preparadores físicos e cientistas da área [Rochel; Tricoli & Ugrinowitsch 2011], sendo necessárias novas técnicas para *follow-up* desses atletas.

As tabelas abaixo representam as adaptações neurais, metabólicas, morfológicas e enzimáticas, especificamente por valência física trabalhada. Adaptado [Monteiro e Lopes 2015].

Tabela 2. Adaptações neurais, metabólicas, morfológicas e enzimáticas

	NEURAIS	METABÓLICAS	MORFOLÓGICAS
Resistência de Força	Baixo	Anaeróbio Lático	Média a Baixa Fibras tipo I e II
Resistência de Força Hipertrófica	Médio/Baixo	Anaeróbio Lático	Média a Alta Fibras tipo I e II
Força Máxima	Alto	Anaeróbio Lático	Baixa Fibras tipo II
Potência (Força Explosiva)	Médio/Alto	Anaeróbio Lático	Media Fibras tipo II

Tabela 3. Adaptações neurais, metabólicas, morfológicas e enzimáticas e velocidade

	NEURAIS	METABÓLICAS	MORFOLÓGICAS
VELOCIDADE	ALTO	ANAERÓBIO ALÁTICO	MÉDIA A ALTA FIBRAS TIPO II

Tabela 4. Adaptações de resistência aeróbica e anaeróbica

	ENZIMÁTICA	METABÓLICAS	MORFOLÓGICAS
Resistencia abaixo do limiar	*MCT1, Citrato sintase, VO ₂ max e Velocidade de *LV1	Aeróbio	Baixo Fibras tipo I
Resistencia no limiar	- MCT1, Citrato sintase, - VO ₂ max - MCT4 melhora no tamponamento muscular Piruvato desidrogenase	Aeróbio Anaeróbio	Baixo Fibras tipo I e II

* **MCT** – Transportadores de monocarboxilato, * **LV** – Limiares ventilatórios

2.4 - Capacidades/valências físicas

Conhecer as capacidades biomotoras e suas formas de manifestação torna-se determinante para elaboração de um processo de monitoramento e planejamento do macrociclo de treinamento. É necessário evitar o treinamento concorrente que possa induzir uma adaptação negativa de forma aguda ou principalmente crônica, o que significaria depleção ao invés de supercompensação. A combinação, do treinamento de força com o treinamento de resistência, é considerada um estímulo ideal para promover tanto ganhos neuromusculares quanto cardiovasculares [Cadore et al. 2012; Izquierdo et al. 2001; Mikkola et al. 2007; Silva et al. 2012]. Entretanto, alguns estudos têm mostrado que o treinamento concorrente pode resultar em ganhos de força mais baixos em comparação com treinamento de força por si só, e esse fenômeno é o chamado "efeito de interferência" [Bell et al., 2000 ;

Leveritt et al. 2003; McCarthy et al. 2002]. De acordo com Monteiro e Lopes, 2015, são apresentadas as capacidades biomotoras e suas formas de manifestação de forma resumida, já destacando a concorrência em seções duplas [Monteiro e Lopes 2015].

Tabela 5 – Concorrências em treinamentos combinados

Capacidades	Capacidades Prejudicadas
<i>Força Máxima + Endurance</i>	Força Máxima
<i>Res. Força (Hipertrófica) + Endurance</i>	Res. Força Hipertrófica
<i>Res. Força + Endurance</i>	Res. Força
<i>Força Explosiva + Endurance</i>	Força Explosiva
<i>Velocidade + Endurance</i>	Velocidade
<i>Força Máxima + Velocidade</i>	Se o volume e pausa forem adequados não haverá prejuízo
<i>Força Máxima + Res. Força Hipertrófica</i>	Se o objetivo for força máxima, esta capacidade valência será prejudicada
<i>Res. Força + Força Máxima</i>	Se o objetivo for força máxima, esta capacidade valência será prejudicada
<i>Força Máxima + Força Explosiva</i>	Não há concorrência
<i>Res. Força Hipertrófica + Força Explosiva</i>	Se o objetivo for Força Explosiva, esta capacidade valência será prejudicada
<i>Res. Força Hipertrófica + Velocidade</i>	Se o objetivo for velocidade, esta capacidade valência será prejudicada
<i>Res. Força Hipertrófica + Res. Força</i>	Não há concorrência
<i>Res. Força + Força Explosiva</i>	Se o objetivo for Força Explosiva, esta capacidade valência será prejudicada

2.5 - Sistema endócrino, cargas de treino, adaptações e a periodização do treinamento

Poucos estudos e com limitações avaliaram a secreção múltipla hormonal frente ao exercício [Mc Ardle et al 2008], justificados pelas complexas interações entre o sistema endócrino e nervoso, incrementadas pelas variações hormonais ligadas a prescrição dos exercícios, magnitude das cargas e até o ritmo circadiano [González-Badillo et al., 2006]. Entretanto, estudos mais recentes mostram que

existem algumas relações entre o sistema endócrino e o exercício físico. A secreção de GH foi significativamente atenuada após suplementação com antioxidantes [Ackerman et al 2014].

Já para praticantes de atividades foram encontrados valores significativos de alteração na relação testosterona cortisol salivar após seis semanas de treinamentos [Hayes et al. 2014]. Analisando jovens em um treinamento periodizado especificamente para desenvolvimento da Força, não encontraram diferenças significativas no Estradiol e o sulfato de Deidroepiandrosterona e alterações significantes em Testosterona total e livre, após a período de treinamento [Sung et al. 2014]. Com relação ao treinamento de força, temos encontrado estudos indicando que a intensidade do exercício influencia a secreção de cortisol [Kraemer, Hakkinen, Newton, Nindl, Volek, McCormick, Gotshalk, Gordon, Fleck, Campbell, Putukian & Evans, 1999; Mulligan, Fleck, Gordon, Koziris, Triplett-Mcbride & Kraemer, 1996] contudo outros estudos indicam que podemos variar tanto a intensidade quanto o volume de treinamento que nenhuma resposta hormonal será verificada [Hough, Papacosta, Wraith & Gleeson, 2011; Roschel, Barroso, Batista, Ugrinowitsch, Tricoli, Arsati, Lima-Arsati, Araujo & Moreira, 2011; Smilios, Pilianidis, Karamouzis & Tokmakidis, 2003]. Pesquisadores classificam a variação hormonal frente ao exercício como multifatorial, supracitado por Mc Ardle et al 2008, e sendo influenciada pela hora do dia, estado alimentar e tempo de coleta após o exercício.

Tabela 6 – Tabela adaptada Hormônios e exercício [MC Ardle et al 2008].

HORMÔNIO	RESPOSTA AO TREINAMENTO
Hormônios do Hipotálamo e Hipófise	
GH	Nenhum efeito sobre os valores de repouso, elevação menos dramática durante o exercício.
ACTH	Valores aumentados com exercício
Prolactina	Evidencias de que reduz os valores de repouso com exercício
FSH, LH e Testosterona	As mulheres treinadas possuem valores deprimidos e homens tendem a aumentar com treinamento de longa duração

Hormônios da Hipófise Posterior	
Vasopressina (ADH)	Ligeiramente reduzida
Ocitocina	Nenhuma pesquisa disponível
Hormônios Tireóideos	
Tiroxina (T4)	Concentração reduzida de T3 total e aumentada de tiroxina livre em repouso
Triiodotironina (T3)	Maior elevação de T3 e T4 durante o exercício
Hormônios Supra-renais	
Aldosterona	Nenhuma adaptação
Cortisol	Ligeira elevação durante o exercício
Adrenalina e Noradrenalina	Menor secreção em repouso
Hormônios Pancreáticos	
Insulina	Maior sensibilidade a insulina, a diminuição normal da insulina durante o exercício é reduzida grandemente com o treinamento

2.6- Sistema imune e adaptações de treinamentos

Uma sessão de exercício moderado reforça as funções imunes e as defesas do hospedeiro por várias horas e minimiza seus impactos provocando uma maior proteção e resposta positiva de imunossupressão [Mc Ardle et al 2008]. Ainda segundo o autor, os efeitos mais proeminentes são aumento na atividade das células destruidoras naturais (NK - natural killer) seguidas de subpopulações de linfócitos fagocíticos aprimorando a capacidade citotóxica do sangue e proporcionando a primeira linha de defesa contra os patógenos. Porém, no exercício intenso ou exaustivo de forma prolongada (e outras formas de estresse extremo ou de treinamento aumentado) deprime profundamente a primeira linha de defesa do organismo contra infecção [Keast D, et al 1988]. Vários estudos indicam imunossupressão em atletas de alto rendimento, apesar da redução da carga interna de treino no período competitivo. Uma redução da tolerância ao estresse acompanhada por um aumento da severidade da ITRS - Infecção do trato

respiratório superior pode indicar um período de descanso” ou como na nomenclatura usual da periodização do treinamento “recuperativo” insuficiente, ou seja, apesar da redução do volume do treinamento, não se observou super compensação e melhora da performance [Moreira A, Nakamura FY, Cavazzoni PB, Gomes JH, Martignago P. 2012]. Além disso, a magnitude do estresse parece induzir o aumento da severidade de ITRS. A hipótese “janela aberta” alega que um aumento desordenado no treinamento ou na competição expõe o atleta altamente condicionado a um estresse que não é normal e que deprime transitória porém profundamente, a função das células NK (natural killer). Esse período de imunossupressão (janela aberta) pode reduzir a resistência natural a infecção [Kohut ML, et al 2001]. A avaliação da imunoglobulina A (IgA) esta tem sido utilizada como ferramenta na avaliação da carga interna de treinamento. A IgA parece responder à intensidade do exercício, sendo um importante marcador da função imunológica do atleta, estando associada com a incidência de infecções do trato respiratório superior [Ahtiainen, Pakarinen, Alen, Kraemer & Hakkinen, 2005; Nieman, 1994]. Os exercícios de intensidade moderada estimulam uma resposta anti-inflamatória, enquanto aqueles de alta intensidade tendem a promover respostas pró-inflamatórias, importante ter esta visão macro, visando diminuir os danos na musculatura esquelética [Dutra et al 2012]. Estas alterações são vistas em células apresentadoras de antígeno (como macrófagos e células dendríticas), neutrófilos, células NK e em moléculas de superfície como os receptores do tipo Toll (TLR) e do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), além das modificações promovidas em todo o repertório de citocinas [Zaldivar F, Wang-Rodriguez J, Nemet D, Schwindt C, Galassetti P, Mills PJ, et al 2011]. Deve-se considerar ainda que os dados indicam que o exercício agudo realizado por pessoas destreinadas aumenta o estresse oxidativo, no entanto, a prática regular de exercício pode contrapor este efeito aumentando a atividade de enzimas antioxidantes e reduzindo a produção de oxidantes [Leeuwenburgh E Heinecke, 2001].

2.7- Os Biomarcadores

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas ou celulares que frequentemente são quantificadas em líquidos, como soro de sangue, urina ou saliva [Hulka, 1990; Moreira, 2004]. Embora várias biomoléculas forneçam uma abordagem dinâmica para diagnóstico, prognóstico e rastreamento de várias

doenças, somente nas últimas décadas, alguns biomarcadores têm emergido como uma ferramenta interessante no esporte. Geralmente, eles têm sido utilizados para monitorar o progresso no treinamento, desempenho e, possivelmente, Overtraining entre atletas de várias modalidades [Hug et al., 2003; Sanchis-Gomar e Lippi, 2014; Palacios et al, 2015; Becatti et al., 2017]. Apesar deste aumento no interesse em biomarcadores, ainda há poucos estudos com jogadores de vôlei [Mazon et al, 2013; Kocabaş et al., 2016]

Estudos fisiológicos anteriores demonstraram que o voleibol é um esporte de equipe (referido como o mundo é o 5º. mais popular) com componentes aeróbios e anaeróbios, caracterizados por glicogenólise e lipólise acompanhada de alta intensidade e movimentos rápidos (por exemplo, bloqueios e ataques), respectivamente [Kunstlinger et al., 1987; Smith et al., 1992]. Mais intensamente, voleibol de praia (VP) é um subtipo deste desporto constituído por breves períodos de atividade máxima para longos períodos de atividade de intensidade moderada e baixa [Homberg, 1994; Medeiros et al., 2014]. Mais especificamente, não existem ainda dados consistentes demonstrando a aplicabilidade dos biomarcadores para jogadores de VP.

Na busca por biomarcadores e sua correlação com os processos de treinamento, vários estudos indicam como monitorar o atleta, todavia, uma das maiores dificuldades encontradas ainda é determinar de forma objetiva, qualitativa e quantitativa quais os indicadores que podem sinalizar antecipadamente um descompasso na dose e efeito do treinamento. Espera-se assim evitar complicações importantes que levem ao sobre treinamento ou *Overtraining* e *Overreaching*. Sem atletas de alto rendimento na amostra, podemos verificar uma proposta interessante de catalogação de alguns Biomarcadores, correlacionando com macro áreas para facilitar nosso entendimento no estudo de GONZÁLES et al., 2015:

- a) **Marcadores de fadiga e stress crônico** – Testosterona e Cortisol;
- b) **Marcadores de Overtraining**: Lactato, CPK (Creatina Quinase), Creatinina, Amônia, Lactato Desidrogenase, Ácido Úrico e Ureia.
- c) **Marcadores de Risco Cardiovascular**: Homocisteína, Troponina Cardíaca
- d) **Marcadores de stress oxidativo**: Malondialdeído e Proteínas Cabonilas; superóxido dismutase (SOD), Glutadiona Peroxidase (GSH), Espécies reativas de Oxigênio ROS [Gonzáles et al 2015].

- e) **Marcadores de processos inflamatórios:** Proteína C reativa, Interleucina 6, Leucócitos.

Como os valores de referência para os biomarcadores dos atletas do VP permanecem desconhecidos, esses parâmetros isolados solicitados por médicos do esporte parcialmente podem contribuir para a má interpretação dos resultados, culminando com decisões inadequadas pelo staff com o atleta profissional do VP, como observado em outras modalidades [Banfi et al., 2012; Lewis et al, 2016; Becatti et al., 2017]. Neste contexto, mesmo que seja um desafio em muitos esportes diferentes, é relevante conhecer valores de referência dos atletas de VP para uma melhor compreensão da resposta de treinamento e otimizar o processo de periodização.

Em paralelo, evidências recentes têm mostrado que os períodos de treinamentos intensos podem desencadear uma alta produção de espécies reativas de oxigênio [Vollaard et al., 2005; Yavari et al, 2015; Reid, 2016; Becatti et al., 2017]. Curiosamente, embora muitos estudos tenham relatado que ROS estão envolvidas na lesão muscular e fadiga crônica, outros têm sugerido que os baixos níveis de ROS são fundamentais para um papel protetor nas adaptações induzidas pelo exercício [Mattson, 2008; MC Leay et al, 2017; Becatti et al., 2017]. Entretanto, o caminho que leva a esta biodisponibilidade exata de ROS que pode melhorar o desempenho sem comprometimento dos efeitos adaptativos ainda precisa ser elucidado [Powers et al, 2011; MC Leay et al., 2017]. Assim, monitoramento de níveis ROS em atletas VP também pode ser uma ferramenta inovadora para prever o risco de lesões, *Overreaching* ou *Overtraining*.

2.8– A importância do monitoramento

As adaptações metabólicas e/ou funcionais do organismo na prática regular de exercícios físicos podem promover várias formas de estresse mecânico e metabólico e, por consequência levar o organismo a reagir para manter sua homeostasia. Neste processo, a ação de enzimas, como a lactato desidrogenase-LDH e a creatina quinase-CK; hormônios, como o cortisol, testosterona, hormônio do crescimento e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina; anticorpos (IgA), citocinas e metabólitos resultantes da degradação de substratos e/ou de tecidos, como o lactato, a amônia e a ureia merecem destaque maior [Lapin et.al 2007 apud Lopes 2005].A análise destes metabólitos pode ser utilizada no controle das cargas de

treinamento e monitoramento das respostas fisiológicas do organismo frente ao exercício físico.

a) (Cortisol, testosterona e relação T/C)

Quando a razão T/C é aumentada, ou seja, a concentração de testosterona é maior que a concentração de cortisol no período de descanso, isto indica resultado positivo frente ao treinamento), já a depleção sugere que o método de treinamento utilizado representa um estímulo estressor intenso para o organismo [Mcardle W, Katch FI, Katch VLD 2003].

b) GH e IGF-1

[Prestes et. al., 2006] indicam que com relação aos estados de anabolismo e catabolismo, o eixo GH, Fator de Crescimento insulina *grow factor-I* (IGF-I) é um sistema que integra mediadores, receptores e proteínas ligantes que modulam o desenvolvimento de muitos tecidos e também estão envolvidos com a adaptação ao exercício [Nemet et. al.,2002] demonstraram decréscimo de elementos do eixo GH-IGF-I na circulação em adolescentes, sendo este efeito associado a um estado catabólico após exercício aeróbio e intenso.

c) Citocinas e Imunoglobulinas

As citocinas são polipeptídios ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos [Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R: Citocinas e Dor 2011]. Podemos ainda citar que é um termo genérico empregado para caracterizar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes: monócitos, macrófagos, Linfócitos e outras que não sejam linfoides. As citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pro-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória [Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Citocinas e Dor 2011]. A Interleucina 6 (IL-6) é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, operação e

queimadura. Após lesão, concentrações plasmáticas de IL-6 são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias [Lin E, Calvano SE, Lowry SF 2000] [Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G et al 2000].

d) Catecolaminas

Durante o exercício incremental, as concentrações de adrenalina e noradrenalina (catecolaminas) correlacionam-se com o aumento exponencial no lactato sanguíneo, este por sua vez amplamente monitorado por treinadores e preparadores físicos, porém sem esta conotação de controle correlacionado a outros marcadores [Koppel M, et al. 1988].

e) Enzimas (CPK, LDH)

Além do estresse metabólico promovido pelo exercício físico, as ações musculares (contração e relaxamento) podem induzir ao estresse mecânico ao ponto de danificar o tecido muscular [Lieber et al., 2002]. A concentração sanguínea da enzima CK tem sido utilizada como indicador de estresse fisiológico induzido por estresse mecânico. [Mujika et al., 2004]. Esta enzima está presente no músculo e eleva-se na corrente sanguínea por alteração da permeabilidade da membrana do tecido muscular, sendo considerada indicador de proteólise muscular relacionado com a intensidade e duração do exercício [Noakes, 1987]. A Lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima catalítica encontrado na maioria dos tecidos do corpo, e especificamente no coração, fígado, rins, músculos, células do sangue, cérebro e pulmões. Desempenha um papel importante no metabolismo da energia anaeróbia, auxiliando na conversão reversível piruvato em lactato no final da glicólise. Quando ocorre uma lesão do músculo ou destruição das fibras musculares, os níveis de LDH são significativamente aumentadas [Gonzales et al 2015].

f) Metabólitos (lactato, ureia)

Durante o exercício prolongado com intensidades abaixo do limiar anaeróbio, as catecolaminas aumentam de forma duração-dependente, no entanto, as concentrações de lactato permanecem constantes ou até mesmo reduzem [Urhausen et al., 1995]. Se a intensidade do exercício exceder 5% ou mais do limiar anaeróbio ocorre acidose, concomitantemente, a concentração das catecolaminas aumenta de forma intensidade dependente, sinalizando alta atividade simpática. Os

exercícios de curta duração e alta intensidade (anaeróbio láctico) são caracterizados por uma maior liberação de catecolaminas [Urhausen et al., 1995].

g) Proteínas séricas marcadoras de inflamação (proteína C reativa e ferritina)

Promove a interação entre imunidades humoral e celular. Uma das respostas mais importantes e estudadas da fase aguda envolve o aumento na síntese hepática, com consequente aumento na corrente sanguínea, das chamadas proteínas de fase aguda. Dentre elas, destacam-se a proteína C-reativa (PCR). Em contrapartida, existem algumas proteínas que têm sua concentração diminuída na fase aguda, a fim de disponibilizar substratos para as proteínas de fase aguda positivas. São chamadas de proteínas de fase aguda negativas. Dentre elas destaca-se a albumina (Silva O C Fernando & Macedo V Denise 2011). A Proteína c-reativa (PCR) ou CRP (do inglês "C-reactive protein") é uma proteína plasmática reagente de fase aguda produzida pelo fígado. Sua função fisiológica é ligar-se à fosfocolina expressa na superfície de células mortas ou lesionadas (e alguns tipos de bactérias), para iniciar sua eliminação ao ativar o sistema complemento e células que fazem fagocitose (digerem outras células), funcionando como uma opsonina. É um indicador extremamente sensível de inflamação. Sua concentração é muito baixa em indivíduos saudáveis, porém na presença de infecções ou respondendo a estímulos inflamatórios pode ter um aumento de até 1.000 vezes no indivíduo. Em casos de inflamação sistêmica, nosso fígado passa a produzir diversas proteínas diferentes, chamadas de proteínas de fase aguda [Neto, Salles & Carvalho 2009]. A Ferritina é uma proteína encontrada em todas as células, especialmente nas envolvidas na síntese de compostos férricos e no metabolismo e reserva do ferro. Sua concentração aumenta em resposta a infecções, traumatismos e inflamações agudas. A elevação ocorre nas 24 a 48 horas iniciais, com um pico no terceiro dia, e se mantém por algumas semanas (Salles, Neto, & Carvalho, 2009).

h) Íons (Ferro e cálcio)

O papel biológico que melhor caracterizada pelo ferro ocorre através de sua incorporação na hemoglobina e mioglobina, proteínas responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigênio (Deldicque, Francaux, & Glenn, 2015). Aproximadamente 65% do ferro no organismo é incorporado em hemoglobina, e estudos clássicos em seres humanos têm demonstrado que o consumo máximo de

oxigênio diminuído ocorre como níveis de hemoglobina em declínio, afetando o desempenho de endurance (Peeling et al., 2014). A ingestão diária recomendada de ferro depende da população e o país e é significativamente mais elevado para mulheres pré-menopáusicas (18 mg / dia) do que para os homens (8 mg / dia), principalmente devido às perdas regulares de ferro que ocorrem por meio de sangramento menstrual (Della Nina 2013). A vitamina D e cálcio desempenham um papel importante na saúde do atleta, treinamento e desempenho. Embora alguns estudos recentes reforcem os efeitos de cálcio e vitamina D para o metabolismo ósseo, também são revelados benefícios extra-ósseos incluindo modulação do sistema imune e muscular, havendo importante relevância no desporto (Peeling et al., 2014). Tem sido proposto que o exercício pode aumentar a perda de cálcio na urina e suor. Ratificados pelas altas concentrações de cálcio no suor (~45 mg/l) já observadas, atletas suando muito durante o treinamento prolongado pode ter favorecer para potencializar a perda de cálcio [Heaney, Recker, Saville 1978].

i) Biomarcadores estresse-oxidativo dependentes

Um delicado equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) vai provavelmente acontecer no organismo, desencadeando o estresse oxidativo. Suas fontes principais de produção são oriundas de vias mitocondriais, enzimáticas (NOS, xantina oxidase, citocromo P 450 e NADPH oxidase) (Porto et al., 2015; Pereira et al., 2016). No sistema cardiovascular, se as concentrações celulares de ROS aumentarem para além dos níveis de homeostase em células endoteliais, a sinalização do NO vascular poderá ser corrompida, resultando em disfunção endotelial, esta se manifesta como inflamação vascular e proliferação [Forstermann 2010]. Enquanto a mudança na relação ROS/NO favorecendo o NO pode promover melhora na função vascular e desfechos cardiovasculares, evidências recentes sugerem que existe um "ponto ótimo". Entretanto o exercício excessivo pode ser prejudicial para o sistema cardiovascular, de maneira similar aos efeitos identificados nos sedentários e portadores de doenças cardiovasculares, a potencial razão seria justamente a inversão desta relação ROS/NO [Nikolaidis et al 2012].

O oxigênio possui tanto efeitos positivos quanto nocivos secundários para os sistemas biológicos. Sua alta reatividade permite ao oxigênio participar na transferência de elétrons de alta energia, e, por conseguinte, auxiliar a geração de

grandes quantidades de adenosina-5-trifosfato (ATP) através da fosforilação oxidativa sendo indispensável para permitir a manutenção de organismos multicelulares complexos [Rua et al 2014]. Por outro lado, o oxigênio tem fundamental importância na formação de subprodutos, conhecidos como espécies reativas do oxigênio (ERO) [Paravicini e Touyz, 2008; Dias et al., 2014].

2.9 - A Força/Potência e a produção de espécies reativas de oxigênio

Segundo (Reid, 2016), o exercício estimula a produção aumentada de ROS no músculo esquelético o que fatalmente induz a uma fadiga precoce, por serem os músculos o alvo mais indicado para ação deletéria de ROS.

Tal efeito induz a uma depressão na função da capacidade contrátil ou dos mecanismos contráteis da célula muscular. Ainda neste estudo é indicado que existe um potencial efeito positivo das ações antioxidantes podendo reduzir tal efeito de diminuição da capacidade de sustentação da produção de força e potencia no músculo.

Essa revisão ratifica que nos atletas os efeitos são maximizados em função da intensidade e volume dos exercícios e por consequência as contrações musculares tendem a serem prejudicadas pelo aumento de ROS. Segue abaixo a figura adaptada por (Reid, 2016).

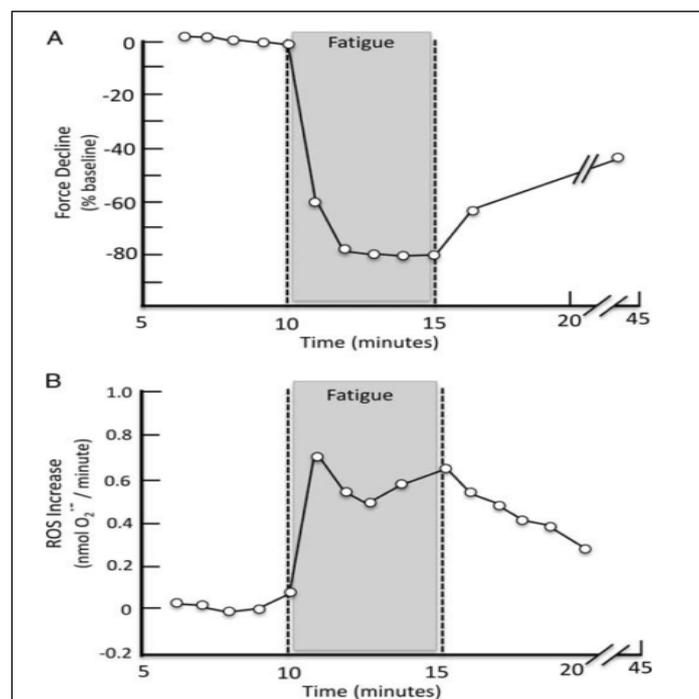


Figura 2 - Produção de ROS pelo músculo aumenta durante a fadiga. A, Força isométrica, durante (área sombreada, Fadiga) e B, produção de ROS concomitante a queda de força.

Com base nesses achados do estudo supracitado, se extrapolarmos a análise pensando na periodização dos treinamentos, esse efeito negativo poderia não favorecer positivamente para ganhos de Força e Potência, nos blocos específicos de trabalho com ênfase nestas capacidades/valências físicas. É exatamente neste período de acumulação (Verkhoshansk 1998) que as fibras musculares assim como os processos inflamatórios devem estar minimizados possibilitando altas produções de kgf – Força e watts – potência. Hora se estabelecemos uma condição com o efeito deletério nos mecanismos contráteis do músculo, pelo aumento de ROS poderemos gerar um “destreinamento” dos atletas ao invés do contrário que seria o resultado esperado. Surge então um novo desafio a partir destas indicações dos marcadores de Estresse oxidativo, elevar e manter os níveis de força, visando alta performance (Verkhoshansk 1998), minimizando a produção de ROS.

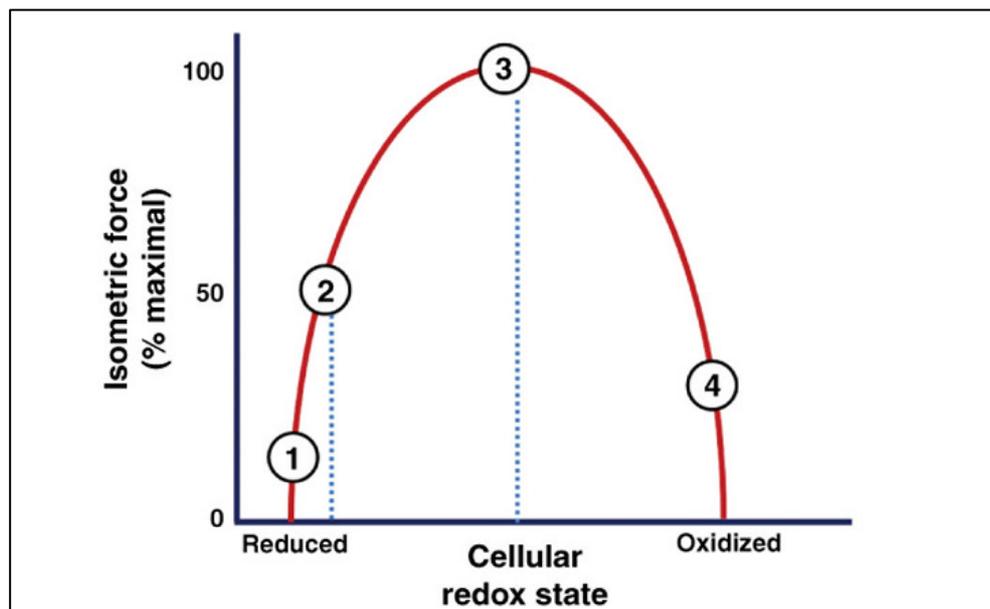


Figura 3 – Níveis de Força Isométrica e estresse oxidativo Adaptado de Reid et al., 1993; Vollaard et al., 2005; Yavari et al, 2015; Reid, 2016; Becatti et al., 2017

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os níveis de biomarcadores convencionais e não convencionais em atletas de elite VP durante as temporadas de 2015 e 2016 (anos pré-Olímpicos e Olímpicos). Estes dados podem identificar uma nova abordagem para otimizar o monitoramento de desempenho de atletas de VP.

2.10 JUSTIFICATIVA

Apesar de atualmente existirem diversos recursos de avaliação e controle para sistemas contemporâneos de periodização de treinamentos, ainda há uma lacuna que pode ser preenchida na área do biomonitoramento dos atletas de alta performance por meio das avaliações biomoleculares, visando individualizar a prescrição, potencializar a performance, monitorar e explorar com segurança a reserva atual de adaptação. Sendo assim, pretendemos descrever o perfil dos biomarcadores convencionais e não-convencionais em atletas de elite de vôlei de praia durante as temporadas pré-olímpica (2015) e Olímpica (2016).

2.11 OBJETIVO GERAL

Identificar dados biomoleculares que possam fundamentar os *staffs*, possibilitando maior segurança na distribuição das cargas de treinamento bem como dos períodos de recuperação, a partir de uma maior interpretação analítica do impacto dos treinamentos e jogos monitorados.

2.12 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Durante as temporadas de 2015 e 2016, foram avaliados nos atletas:

1. O perfil da curva de força e potência;
2. A cinética de biodisponibilidade de ROS, a predominância da principal espécie reativa bem como o índice de apoptose/necrose (biomarcadores não-convencionais);
3. As modulações dos biomarcadores convencionais (lactato, LDH, CK, Testosterona/cortisol), incluindo mais 42 biomarcadores.

3. MÉTODOS

3.1- Amostra

Foram incluídos neste estudo prospectivo e observacional 02 (dois) atletas Olímpicos, adultos, da modalidade Vôlei de Praia (VP), ambos com 30 anos de idade, sem critérios de exclusão. O estudo realizado entre 10 de janeiro de 2015 e 24 de agosto de 2016 foi aprovado pelo Comitê de ética brasileiro para pesquisa humana 'Plataforma Brasil' (#1.540.498). Eles foram informados sobre a investigação, e deram o seu consentimento escrito para participar. Nenhum dos atletas contraiu doenças infecciosas ou recebeu qualquer suplementação / medicação que pudesse modificar diretamente os resultados observados.

3.2 - Periodização do Treinamento

A periodização do treinamento foi dividida nos seguintes três blocos: A) adaptação geral ou introdutória (treinamento de resistência geral); B) acumulação de força e a transição de força para potência (Treinamento de força pura) e C) períodos competitivos (competições mais importantes), todos estes sempre intercaladas com períodos de recuperação entre os respectivos blocos. Durante todo o ciclo, objetivou a manutenção elevada dos níveis de força e potência, devido ao elevado número de competições em todo o ciclo olímpico e pré-olímpico.

3.3 - Evolução da Força e Potência

Os dados de força e potência foram monitorados por um dinamômetro digital computadorizado (PEAK POWER, CEFISE®, Nova Odessa, São Paulo, Brasil) conectado a uma barra. Este equipamento emite um sinal elétrico com cada revolução percebida. Desde que a distância percorrida entre dois sinais emitidos é conhecida, o deslocamento da barra é obtido. Através deste protocolo, os parâmetros obtidos foram potência absoluta (watts) e força máxima (Kgf-Newtons) desenvolvido em toda a fase concêntrica do exercício meio-agachamento, os dados aferidos a uma frequência de 50 Hz.

3.3.1 - Teste de 1 RM – Repetição Máxima

Os atletas de VP passavam por um aquecimento iniciando na bicicleta estacionária por 10 a 20 minutos, acrescidos de alongamento estático e liberação miofascial. Após 5 minutos de intervalo, os atletas executavam de 8 a 10 repetições para familiarização com as máquinas e, estas já ligadas com o dinamômetro digital (PEAK POWER, CEFISE®, Nova Odessa, São Paulo, Brasil), posteriormente partiam para a realização de 8-10 repetições de uma carga leve (~ 50% de 1RM predita). Após mais de 5 minutos de intervalo, eles realizavam uma carga (~ 80% da 1RM estimada) através de única repetição em meio-agachamento. Após cada execução bem-sucedida, o peso era aumentado até a tentativa em que ocorresse a falha no movimento de meio-agachamento. O 1RM foi registrado quando atingido dentro de 5 tentativas, o intervalo de 5 minutos de descanso separava cada teste com incremento de carga. Todas as medições de 1RM foram relatadas em quilogramas e newtons, para análise de dados subsequentes.

3.3.2 - Tete de Potência

Os atletas foram avaliados com o exercício meio-agachamento em alta velocidade, com ênfase para a execução na fase concêntrica (subida de alta velocidade), isolando o componente excêntrico (descida lenta com uma isometria - parada rápida - antes de executar a fase concêntrica). O posicionamento dos pés foi determinado com áreas marcadas no chão. Após o comando do preparador físico, os atletas foram submetidos a seis repetições do “meio-agachamento em alta velocidade” com 60%; 70%; 80% e 90% da carga correlate a 1RM (pré-determinado), intercalada por 5 minutos de intervalo. Finalmente, a melhor potência (watts) na execução do movimento e aferida pelo dinamômetro digital computadorizado foi registrada.

3.4 - Amostras de sangue

Todas as amostras de sangue foram coletadas no pós-jogo de 48h ou pós – bloco, excluindo assim a influência aguda do exercício exaustivo. Entre 9 e 10h, as amostras de sangue foram coletadas da veia ante cubital (na posição sentada) em tubos de vidro de Vacutainer contendo EDTA (Becton, Dickinson e Co, Franklin Lakes, NJ) e centrifugadas a 2.000 g durante 10 min. Em seguida, o soro foi então

armazenado a -20°C . Todas as medições foram obtidas através de analisador bioquímico automático (AU 680, Olympus/Beckman Coulter, Munique, Alemanha) ou analisador hematológico (Coulter LH 750, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

3.5 - Análise de marcadores sanguíneos

Foram analisados e correlacionados com as capacidades/valências físicas, adaptações e fases da periodização de treinamentos e competições (jogos) 48 (quarenta e oito) marcadores sanguíneos, descritos a seguir: HEMOGRAMA e PLAQUETOGRAMA COMPLETO, GLICEMIA, FERRO SÉRICO, FERRITINA, ALFA-AMILASE, SÓDIO, CÁLCIO, POTÁSSIO, MAGNÉSIO, HGH, SOMATOMEDINA, TESTOSTERONA, CORTISOL, URÉIA, NITROGÊNIO UREICO, HDL, LDL, TRIGLICERÍDEOS, COLESTEROL TOTAL, CK, CK-MB, LDH, PCR, TSH, TIROXINA LIVRE, INSULINA, LACTATO, POTÁSSIO, AST, ALT, GGT.

3.6 - Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

O sangue coletado foi acrescido de solução nutritiva (DMEM low-glucose, Sigma) e colocado em um tubo Falcon (BD) em um volume final de 6mL. Em seguida foi feita centrifugação (Equipamento – Eppendorf 5702) por 10 minutos a 1200rpm (rotações por minuto). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de células ressuspenso em 4mL de DMEM. Em outro tubo Falcon foi adicionado 4mL de gradiente de densidade Ficoll-Paquetm PLUS (GE Healthcare), que consiste em uma solução com densidade de 1,077 g/mL. A solução com 4mL de células foi pipetada e colocada pela parede sobre o gradiente de densidade Ficoll-Paquetm PLUS com cuidado para não misturar as duas fases. O tubo contendo 4mL de células + 4mL de Ficoll-Paquetm PLUS, totalizando um volume final de 8ml, foi levado para centrífuga (Eppendorf 5702) com rotor *swing-bucket*, sem freio, por 30 minutos a 1500rpm. Durante a centrifugação, os eritrócitos e leucócitos granulócitos atravessaram a fase orgânica, que corresponde ao gradiente de densidade Ficoll-Paquetm PLUS, sedimentando-se no fundo do tubo. A “nuvem” de CMN encontrava-se na interface entre as duas soluções. Na fase superior, fase aquosa, encontrava-se as plaquetas e proteínas plasmáticas.

O anel de CMN formado entre o DMEM e o gradiente de densidade foi imediata e delicadamente recolhido com uma pipeta de vidro. Em seguida, o material

aspirado foi colocado em um novo tubo Falcon. Como o gradiente de densidade Ficoll-Paquetm PLUS é altamente citotóxico, foi necessário fazer lavagens seriadas a fim de eliminar possíveis resíduos remanescentes desse gradiente. Logo, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm com uma solução salina tamponada (PBS 10%) para lavar o excesso de gradiente. Essa lavagem foi repetida três vezes para garantir a remoção completa do gradiente de densidade. As células isoladas foram ressuspensas em PBS para posterior análise em citômetro de fluxo [Campagnaro et al., 2012; Porto et al., 2015].

3.7 -Determinação da viabilidade e apoptose (anexina)

Para determinação de viabilidade celular foi utilizada marcação com anexina V e PI, seguida de análise em citômetro de fluxo. Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolipídio fosfatidilserina (FS). Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V conjugada a um fluorocromo. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são capazes de excluir o corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial de apoptose. O PI penetra em células, nas quais há perda da integridade da membrana celular, enquanto que células marcadas apenas com Anexina V-FITC indicam morte apoptótica. Já as células marcadas com ambos os fluorocromos representam a porcentagem de células nos estágios finais de apoptose [Campagnaro et al., 2012; Porto et al., 2015].

Foram retiradas alíquotas de 200µl de células e estas, centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. Em seguida, ressuspensas em 400µl de tampão *Binding Buffer* 10% (10mmol HEPES, NaOH, pH7,4, 140mmol NaCl, 2,5mmol CaCl₂) na concentração de 1x10⁶ células/ml. A seguir, 100µl desta solução (1x10⁵ células) foi transferida para um novo tubo, onde receberam 2µl de anexina V-FITC e 2µl de PI. As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz. Para controle positivo foi utilizado H₂O₂. Posteriormente às marcações, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1200 rpm e por fim, 400µl

de PBS com 10% Soro Fetal Bovino serão adicionados a cada tubo e as amostras analisadas no citômetro de fluxo. Este ensaio determina a proporção de células vivas (anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina V (anexina V+/PI-); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V+/PI+). O resultado final foi um gráfico de *dot plot* com quadrantes Q1, Q2, Q3, Q4 sendo, Q1: positiva apenas para PI – células com dano; Q2: Apoptose (positiva para Anexina e PI); Q3: células viáveis (negativa para Anexina e PI); Q4: apoptose precoce (Positiva para Anexina e negativa para PI). Para cálculo da taxa de apoptose total foram somados quadrantes Q2+Q4. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* DIVA e FCS *Express 4 Flow Research Edition* [Campagnaro et al., 2012; Porto et al., 2015].

3.8 - Medida de estresse oxidativo pela determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (DHE e DCF)

As espécies reativas de oxigênio (ERO) foram medidas por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF-DA) e pelo etídeo, que são produtos da oxidação do diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) e do dihidroetídeo ou hidroetidina (DHE), compostos sensíveis, principalmente, ao H₂O₂ e ao •O₂⁻, respectivamente. A citometria de fluxo é uma ferramenta que proporciona a determinação das características físicas, biológicas e/ou químicas das células. Essa metodologia permite a análise de um grande número de células em um curto período de tempo. Todo material biológico, com tamanho entre 0,5 e 50µm, que contém células ou partículas em suspensão pode ser analisado por citometria de fluxo [Rua et al 2014]. A citometria de fluxo é uma tecnologia que mede simultaneamente e, em seguida, analisa várias características físicas das partículas individuais, geralmente células, à medida que passam pela corrente fluida através do feixe de luz. As propriedades medidas incluem o tamanho relativo de uma partícula, granulidade ou complexidade interna e intensidade de fluorescência [Tonini et al., 2013; Dias et al., 2014].

O H2DCFDA é um éster, não- fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o H2DCFDA perde o grupo diacetato, pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que pode ser oxidado pelo H_2O_2 a diclorofluoresceína (DCF), composto altamente fluorescente (Figura 3). Convém salientar que outras ERO, como NO, $ONOO^-$ e radical peróxil (ROO^\cdot) podem também oxidar o DCFH. Dessa forma, o DCF não pode ser caracterizado como um marcador exclusivo para H_2O_2 .

O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, também entra livremente na célula e é relativamente mais sensível ao $\cdot O_2^-$, entretanto pode reagir com outras ERO, como o radical hidroxila ($\cdot OH$), para formar etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando à amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm).

Para este experimento as células foram ressuspensas em 1mL de PBS na concentração de 1×10^6 células/mL. As amostras foram incubadas, no escuro, com 20ul de solução de DCF-DA ($10\mu M$) e 20 ul de DHE ($160\mu M$), por 30 minutos à $37^\circ C$ e, em seguida centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400ul de PBS com 10% de SFB. A aquisição dos dados foi realizada com citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com laser de 488nm. Os sinais foram obtidos utilizando filtros de 585nm para etídeo e 530nm para DCF-DA. Para o controle positivo do DCF-DA, as células foram incubadas com $50\mu M H_2O_2$ e para o controle positivo do DHE, as células foram incubadas com e $100\mu M$ de doxorrubicina por 5 minutos. Para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em PBS. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* DIVA, pela determinação da mediana de intensidade de fluorescência de 10.000 células. (Campagnaro, 2012)(Porto, 2015).

Convém frisar que todos os protocolos de citometria de fluxo foram realizados no laboratório de Fisiologia Translacional da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

3.9 - Análise estatística

Como este estudo é descritivo, não foi feita a análise estatística em grande parte do estudo. Quando apropriado, t-teste foi aplicado. Os dados são apresentados como o média \pm desvio-padrão (SD). Todos os dados foram processados usando o *software* Graph Pad Prism 5.

4. RESULTADOS

4.1 – Sujeitos, Características Gerais

As características antropométricas dos atletas durante as temporadas de 2015 e 2016 (pré-Olímpicos e Olímpicos anos) estão resumidas na tabela 1. Embora eles apresentem semelhanças na etnia, idade, percentual de gordura e massa magra, suas estruturas físicas distintas (altura, peso, IMC) induzem-lhes a assumir funções fixas durante todos os jogos (AC: jogador de ataque e bloqueio e BS: jogador defensivo).

Tabela 7. Características antropométricas dos jogadores de elite de Vôlei de Praia

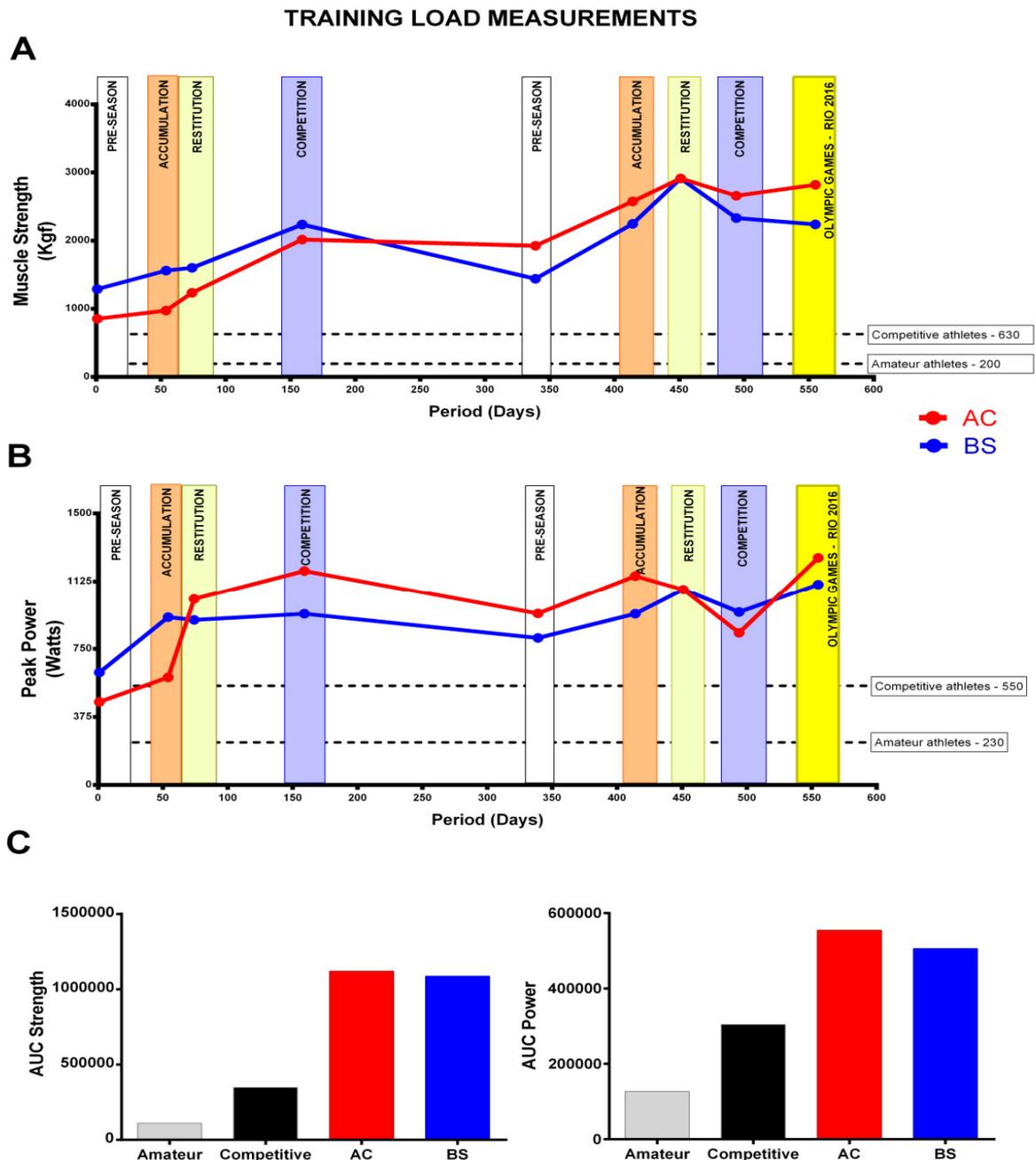
Parâmetros	AC	BS
Raça/Etnia	Branco	Branco
Idade (anos)	30	30
Altura (cm)	202	185
Peso (Kg)	113.5 (112.4-116.4)	90 (88.8-91.2)
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	27.9 (26.7-28.2)	26.3 (25.9-26.6)
Percentual de gordura	12 (9.33-15.35)	11 (8.97-12.39)
Percentual de massa magra	88 (84-90.6)	89 (87.6-91.3)

4.2 - Medições das cargas de treinamento

O desempenho dos atletas VP está fortemente associado com parâmetros de força-potência. Estes dados foram gravados rotineiramente em cada bloco da periodização. A Figura 1 demonstra o sucesso do perfil semelhante de força (A) e potência (B) entre esses atletas de elite durante as temporadas pré-olímpica (2015) e olímpica (2016). Como desejado intencionalmente, os índices de força e potência aumentados nos períodos de acumulação, permanecendo estável, aparecendo

todos os pontos mais elevados do que os atletas de categoria (~ 3 vezes e ~ 2 vezes respectivamente) e atletas amadores ou praticantes (~ 10 vezes e ~ 4 vezes, respectivamente), conforme demonstrado na figura C.

Figura 4. Força (A) e potência (B) perfis avaliados em medalhistas de ouro RJ 2016,



jogadores de elite de vôlei de praia. Conforme desejado, ambos os índices aumentaram nos períodos de acumulação, permanecendo estável durante as temporadas de 2015 e 2016. C) barra de gráficos mostrando a área sob a curva (AUC) de força e poder em comparação com atletas de categorias e amadores ou praticantes.

4.3 - Biomarcadores não convencionais: Medições de ROS e apoptose

Baseado em dados anteriores mostrando que o músculo esquelético fornece a maior fonte de geração de ROS, durante o exercício com possíveis alterações no sangue [poderes e Jackson, 2008; Powers et al, 2011; MC Leay et al, 2017; Becatti et al, 2017], foram avaliados pela primeira vez, os níveis ROS intracelular de leucócitos em jogadores de elite VP. Conforme demonstrado na Figura 2A, observamos que, em ambos os atletas os principais incrementos da biodisponibilidade ROS de glóbulos brancos ocorreram em períodos de atividade de exercício intenso (períodos de “acumulação” e “competição”) com um aumento de aproximadamente 7 vezes comparado com períodos “pré-temporada” ou “restituição”. Entre o ROS avaliados, as alterações de $\bullet\text{O}_2$ entre períodos era mais evidente comparado com H_2O_2 ou hROS. Quando avaliado o índice ou a razão de apoptose/necrose nas mesmas amostras (figura 2B), observou-se que seus principais incrementos seguiram o perfil da produção ROS também em ambos os atletas atingindo os mais altos níveis em períodos de competição.

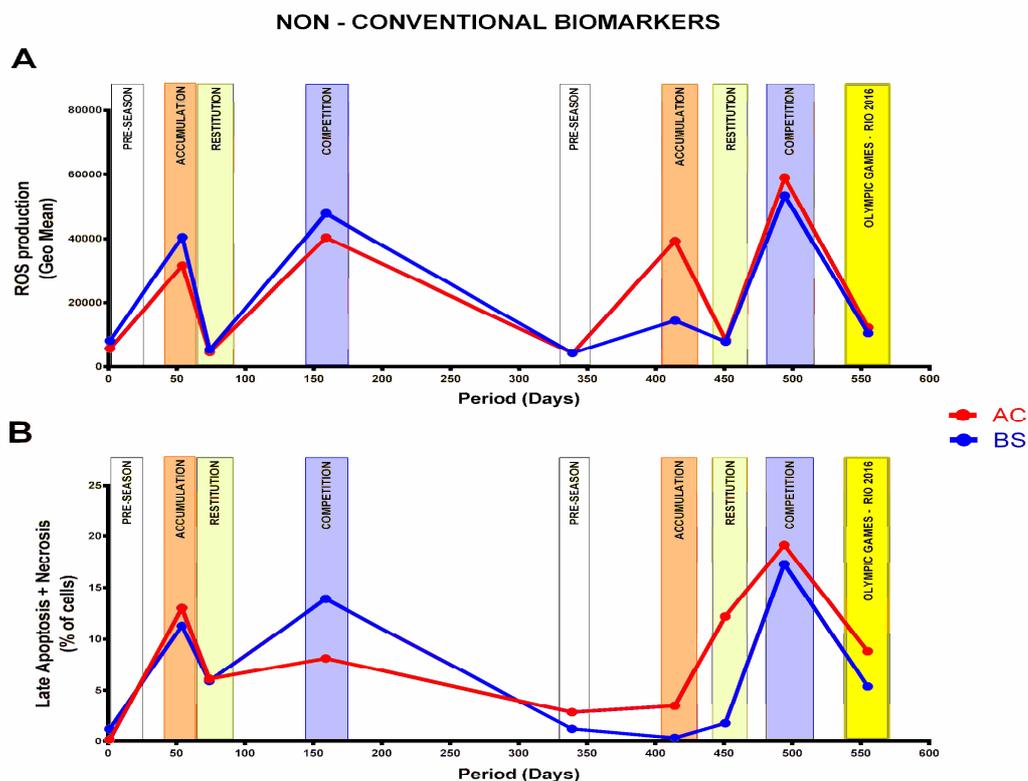


Figura 5. Evolução de marcadores não convencionais, (A) produção de espécies reativas de oxigênio no sangue – ROS e (B) Apoptose tardia + Necrose, em jogadores de elite de VP

medalhistas de ouro nos jogos RIO 2016, durante os períodos pré-olímpicos 2015 e olímpico 2016.

4.4 Evolução de Marcadores Convencionais

Em nosso estudo longitudinal, analisamos um total de 48 biomarcadores convencionais como potencialmente relevantes para o acompanhamento regular dos atletas. Entre eles, temos demonstrado na Figura 3, os biomarcadores principais exploradas atualmente em medicina do esporte. Na figura 3A e B, observamos em ambos os atletas de elite que o lactato sérico e lactato desidrogenase não mostraram qualquer modificação relevante durante as diferentes etapas da periodização, revelando valores compatíveis com os de referência para não-atletas ao longo dos períodos. Em relação à creatina quinase sérica (Figura 3), mostramos que os valores de BS eram mais elevados do que os valores de referência clínica em ~ 95% das estações do ano, principalmente em períodos de atividade de exercício intenso (períodos de “acumulação” e “competição”). No entanto, os dados de AC não demonstraram um perfil semelhante, revelando alta valores somente em ~ 40% ao longo do ciclo e independente dos períodos de atividade de exercício intenso. Na figura 3D, os níveis séricos de CK-MB (um isoform de CK) foram semelhantes entre os atletas os quais se mantiveram abaixo do valor de referência clínica máxima durante todo o ciclo.

Além dos clássicos e convencionais biomarcadores, também foram avaliadas duas razões de hormônios atualmente explorados na medicina esportiva para avaliar o status anabólicos/catabólicos: testosterona/cortisol (T/C) [Papacosta et al, 2015; Russell et al, 2017] e insulina fator de crescimento/cortisol (IGF/C) [Nassib et al., 2016], representada por figuras 3E e 3F, respectivamente. Embora os valores absolutos não sejam iguais, as curvas apresentam um perfil semelhante, indicando um predomínio de anabolismo na fase olímpica (2016 - 350 dias depois), em comparação com a fase do pré-olímpico.

Os 48 marcadores conforme tabela 2 indicam parâmetros compatíveis com “pessoas normais” o que ratifica a condição determinante para o alto rendimento estar vinculada as adaptações fisiológicas impostas pelas cargas: intensidades e volumes de treinamentos.

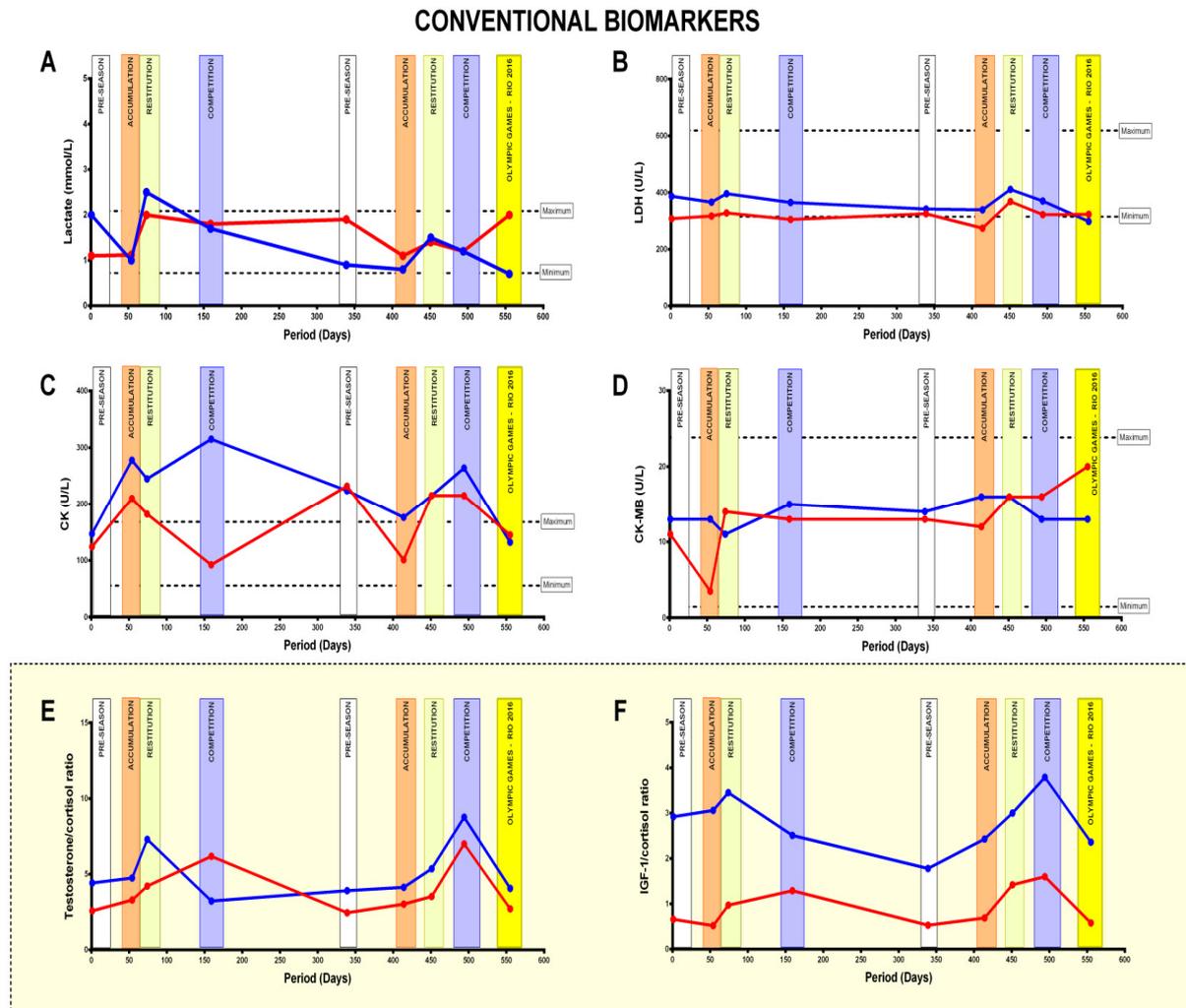


Figura 6. Medição de biomarcadores convencionais em jogadores de elite de VP durante os anos pré-Olímpico 2015 e Olímpico 2016. A) Análise de Lactato sérico e B) Lactato Desidrogenase mostrando um perfil linear. C) Evolução da Creatina Quinase (CK), demonstrando predominância em BS comparado a AC enquanto no D) Isoforma CK-MB mostra comportamento similar em ambos atletas. Na caixa em destaque amarelo é demonstrado o comportado similar entre as razões dos hormônios anabólico/catabólicos: E) T/C (testosterona/cortisol) and F) IGF-1/C (insulin growth factor/cortisol).

5. DISCUSSÃO

Embora este estudo tenha sido realizado analisando apenas 2 atletas (uma equipe VP completa), tivemos uma oportunidade sem precedentes para investigar o perfil de níveis de biomarcadores não convencionais e convencionais em jogadores de elite de VP durante duas temporadas consecutivas (2015 ano pré-olímpicos e 2016 ano olímpico), culminando na conquista da medalha de ouro olímpica nos jogos Rio 2016. Portanto, esses dados podem abrir novas estratégias de pesquisa sobre medicina esportiva, especialmente para otimizar o monitoramento de desempenho dos atletas de VP. Algumas implicações, assim como possíveis hipóteses alternativas desses resultados, estão discutidas abaixo.

Atualmente, sabe-se que os atletas olímpicos são submetidos diariamente a um treinamento excessivo somado a um calendário estressante e extremamente apertado, no que tange a número de jogos e competições, justificados pelas necessidades dos patrocinadores em gerar exposição ou os chamados “impactos mídia”. Isso pode comprometer o desempenho, aumentar o risco de lesões e, paradoxalmente, perder suas competições mais importantes [Winsley e Matos, 2011; Soligard et al., 2015; Schwellnus et al., 2016]. Curiosamente, nosso estudo com atletas VP descreve um caso típico. No período pré-olímpico (2015), houve vários torneios ao longo do ano que exigiram grandes resultados para que os atletas VP pudessem participar das Olimpíadas no próximo ano. Portanto, nesse cenário, havia dois desafios para os funcionários: 1) manter o melhor desempenho (força e potência) ao longo das temporadas e ciclos para atingir seus objetivos, bem como 2) permanecer os atletas VP livre de lesões durante estes dois anos. Felizmente, ambos os objetivos foram alcançados através da exploração de cargas individualizadas incomuns e monitoramento com biomarcadores não convencionais (leucócitos ROS e apoptose / índice de necrose). Interessantemente, observou-se que o perfil de força e potência foi semelhante entre esses jogadores de elite VP durante 2 temporadas (Figura 1), demonstrando um sucesso relevante da adaptação de carga proposta, bem como a interpretação de biomarcadores não convencionais analisados durante este período.

A primeira evidência de que a contração de músculos esqueléticos produz ROS foi relatada por quase 40 anos por Dillard et al. (1978). Em 1982, Davies e colaboradores sugeriram pela primeira vez que a produção de ROS em ratos

poderia modular o músculo esquelético ao exercício [Davies et al., 1982; Powers et al., 2016] sendo confirmada em humanos somente em 2007 [Bailey et al. 2007]. Paralelamente, verificou-se que tanto o exercício aeróbio como o anaeróbio podem gerar ROS de diferentes fontes: mitocondrial [Davies et al., 1982; Reid et al., 1992; Powers e Jackson, 2008; Becatti et al., 2017], xantina oxidases [Sjödín et al., 1990; Becatti et al., 2017] e NADPH oxidases [Pyne, 1994; Becatti et al., 2017] sendo tamponada por uma matriz de mecanismos antioxidantes endógenos (por exemplo, SOD, catalase, GPx) e exógenos (por exemplo vitamina C, E, beta-caroteno) [Reid, 2016; Becatti et al., 2017]. Mais recentemente, numerosos estudos mostraram que, embora baixos níveis de ROS sejam fisiologicamente essenciais para o controle da expressão gênica e modulação da produção de força no músculo esquelético, altos níveis de ROS podem resultar em danos aos miócitos, comprometendo a contractilidade muscular, caracterizando o gráfico conhecido "Curva U invertida" [Dröge, 2002; Ascensão et al., 2008; Hadžović-Džuvo et al., 2014; Reid, 2016; Powers et al., 2016; Becatti et al., 2017]. Apesar destes importantes avanços, o papel fisiológico detalhado dos ROS no exercício em várias modalidades esportivas necessita ser mais compreendido.

Estudos relacionados à produção de ROS com corpo inteiro em seres humanos só se tornaram possíveis após 2010 [Reid, 2016; Powers et al., 2016; Becatti et al., 2017]. Portanto, neste contexto, nosso estudo é inovador na medicina esportiva por algumas razões. Em primeiro lugar, este é o primeiro estudo que relaciona ROS com jogadores de vôlei, identificando uma abordagem inovadora nesta modalidade. Em segundo lugar, reforçamos a ligação entre ROS e danos celulares em atletas de elite, claramente evidenciada pelo incremento da apoptose / necrose celular nos períodos de sobrecarga, como sugerido por outros [Powers e Jackson, 2008; Hadžović-Džuvo et al., 2014; Russell et al., 2017]. Vale ressaltar que as taxas mais altas de apoptose / necrose que observamos foram em períodos mais intensos de atividade física com intervalos curtos entre jogos (ao contrário dos Jogos Olímpicos onde a disputa acontece em dias alternados com dias de descanso e somente uma partida por dia). Esses dados foram fundamentais para estabelecer os períodos de transição pelos profissionais do *staff*, "fugindo" de protocolos de treinamento tradicionais. Conseqüentemente, reduzimos o período de acumulação de 8-12 semanas para apenas 3 semanas, mantendo o mesmo desempenho físico desejado durante 4-5 semanas, evitando assim lesões desnecessárias. Em terceiro

lugar, demonstra-se que é possível detectar estresse oxidativo (mesmo depois de 48h pós-competição ou pós-bloco de treinamento) através da análise direta de ROS leucocitárias no sangue em vez de medidas indiretas (por vias enzimáticas ou moléculas oxidadas) corroborando os dados recentes obtidos com jogadores de futebol de elite que usaram apenas um tipo de sonda (DCF) para detecção de ROS [Becatti et al., 2017]. Curiosamente, como rotineiramente utilizado três diferentes sondas para ROS detecção (DCF, DHE e HPF) [Bôa et al., 2015; Coutinho et al., 2017], foi possível definir qual deles possui maior sensibilidade para medir o estresse oxidativo: sonda fluorescente para $\bullet O_2^-$ (denominada DHE). Em seguida, para evitar gastos desnecessários, sugerimos que em protocolos futuros para atletas de elite, a sonda DHE seja a mais alta prioridade para investigar a homeostase induzida por estresse oxidativo modulada pela atividade física.

Em relação aos biomarcadores convencionais, embora atualmente alguns pesquisadores tenham descrito que eles podem não representar um método confiável para monitorar excesso ou sobreentrenamento em atletas de elite [Ostojic e Ahmetovic, 2008; Reinke et al., 2009; Meyer e Meister, 2011], no vôlei isso ainda é desconhecido. Assim, ao longo dessas duas temporadas de 2015/2016, nossos dados corroboram evidências contemporâneas observadas em outras modalidades esportivas com atletas de elite, mostrando apenas pequenas alterações laboratoriais [Becatti et al., 2017]. Entre todos os parâmetros convencionais avaliados, apenas a CK sérica foi o parâmetro que apresentou valores acima da referência normal durante a maioria das coletas, especialmente com o atleta BS. Curiosamente, detectou-se que na maior parte dos pontos analisados, a alta biodisponibilidade de ROS mostra um perfil similar comparável aos seus altos níveis de CK. Esta observação pode ser explicada: uma vez que os ROS podem perturbar a permeabilidade da membrana bicamada pela oxidação dos componentes da membrana, a CK pode aumentar a sua liberação para o sangue [Brancaccio et al., 2007; Tokarska-Schlattner et al., 2012; Ryu et al., 2016]. Em relação à diferença observada entre os atletas, isso pode ser suportado por variações interindividuais e / ou intensidade de exercício [Brancaccio et al., 2007]. Vale ressaltar que em 2016, BS foi eleito o melhor jogador defensivo e ofensivado mundo, justificando, pelo menos, em parte, sua participação fundamental nos torneios que poderiam culminar com maior incremento de CK.

Como o treinamento e/ou exercício físico é um importante modulador de vias gonadotróficas, somatotróficas e corticotróficas, também avaliamos o perfil dos principais hormônios envolvidos (testosterona, GH progesterona, IGF-1, insulina e cortisol). Embora esses hormônios sejam amplamente investigados na pesquisa esportes, sua aplicabilidade para a rotina da equipe médica para atletas ainda é controversa [Hoogeveen e Zonderland, 1996; Kanaley et al., 2001; Hadžović-Džuvo et al., 2014; Nassib et al. 2016]. Por conseguinte, eles não poderiam ser chamados de 'biomarcadores convencionais' clássicos, justificando assim a apresentação diferenciada (caixa amarela) na Figura 3 (E e F). Conforme observado por outros em diferentes modalidades, nossos resultados não mostraram qualquer relação com periodizações estabelecidas, evidenciando que esses hormônios não podem ser biomarcadores confiáveis para atletas de elite de VP.

Por último, mas não menos importante, sabe-se que alguns pesquisadores avaliaram a relação T/C para inferir o status anabólico/catabólico de atletas de elite mesmo se houver alterações consideráveis de testosterona livre durante o exercício, liberação pulsante e depuração rápida deste andrógeno [Hug et al., 2003]. Alternativamente, descobertas recentes mostraram que o IGF-1 / C pode ser um parâmetro substituto útil de um desequilíbrio entre o metabolismo anabólico / metabólico em relação ao T / C, justificado pela produção linear e meia-vida mais longa do IGF-1 [Hug et al. , 2003; Nassib et al., 2016]. Observando o perfil dessas duas razões em nosso estudo, apoiamos estas observações anteriores, demonstrando que o IGF-1 / C apresentou melhor perfil do que o T / C dos atletas VP (Figura 3F). O IGF-1 / C evidenciou mais claramente o catabolismo na fase pré-olímpica (justificado pela intensa disputa pela conquista da vaga olímpica).

Finalmente, podemos afirmar que marcadores não convencionais (produção de ROS, apoptose / necrose) associados à relação IGF-1 / cortisol podem ser biomarcadores sensíveis para o monitoramento de treinamento e desempenho físico de atletas de elite VP, ajudando a prevenir possíveis estados de sobreentrenamento e lesões.

6. CONCLUSÃO

Em geral, nossos achados sugerem que a produção de ROS leucocitária associada ao índice de apoptose/necrose (classificado como marcadores não convencionais) ea relação IGF-1/cortisol podem ser evidências relevantes durante as periodizações de treinamentos para oVPvisandomonitorar o desempenho e recuperação dos jogadores, em substituição aos biomarcadores convencionais. Esses parâmetros podem ajudar a prevenir possíveis estados de *overreaching*, *overtraining* e lesões, abrindo uma nova via para otimizar o monitoramento de desempenho dos atletas de elite VP.

7. REFERÊNCIAS

1. Ackerman J , Clifford T, McNaughton R L and Bentley D J. *The effect of an acute antioxidant supplementation compared with placebo on performance and hormonal response during a high volume resistance training session.* Journal of the International Society of Sports Nutrition 2015.
2. Ascensão A, Rebelo A, Oliveira E, Marques F, Pereira L, Magalhães J. Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. Clin Biochem. 2008 Jul;41(10-11):841-51. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.04.008.
3. Bailey DM, Lawrenson L, McEneny J, Young IS, James PE, Jackson SK, Henry RR, Mathieu-Costello O, McCord JM, Richardson RS. Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. Free Radic Res. 2007 Feb;41(2):182-90.
4. Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. *Metabolic markers in sports medicine.* Adv Clin Chem. 2012;56:1-54. Review.
5. BARBANTI, V.J. *Teoria e prática do treinamento esportivo.* 2.ed., São Paulo: Edgard Blücher, 1997.
6. Becatti M, Mannucci A, Barygina V, Mascherini G, Emmi G, Silvestri E, Wright D, Taddei N, Galanti G, Fiorillo C. *Redox status alterations during the competitive season in elite soccer players: focus on peripheral leukocyte-derived ROS.* Intern Emerg Med. 2017 Mar 30. doi: 10.1007/s11739-017-1653-7.
7. Bôa IS, Porto ML, Pereira AC, Ramos JP, Scherer R, Oliveira JP, Nogueira BV, Meyrelles SS, Vasquez EC, Endringer DC, Pereira TM. Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. PLoS One. 2015 Dec 16;10(12):e0144329. doi: 10.1371/journal.pone.0144329. eCollection 2015. PubMed PMID: 26674346
8. BOMPA, T. *Theory and methodology of training - the key to athletic performance.* Iowa: Kendall - Hunt, 1994.

9. BORRESEN, J.; LAMBERT, M. I. *The quantification of training load, the training response and the effect on performance*. Sports medicine, Auckland, v. 39, no. 9, p. 779-795, 2010.
10. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. Br Med Bull. 2007;81-82:209-30. Epub 2007 Jun 14. Review
11. Buratti P, Gammella E, Rybinska I, Cairo G, Recalcati S. *Recent advances in iron metabolism: relevance for health, exercise, and performance*. Med Sci Sports Exerc (2014)
12. Campagnaro, Bianca Prandi, *Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2r1c sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos* “Universidade federal do espírito santo centro de ciências da saúde programa de pós-graduação em ciências fisiológicas bianca prandi campagnaro”, 2012
13. Coutinho PN, Pereira BP, Hertel Pereira AC, Porto ML, Monteiro de Assis ALE, Côgo Destefani A, Meyrelles SS, Vasquez EC, Nogueira BV, de Andrade TU, Endringer DC, Fronza M, Costa Pereira TM. Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr (-/-) mice. J Ethnopharmacol. 2017 May 11. pii: S0378-8741(17)31235-7.
14. Carfagno DG, Hendrix JC 3rd. *Overtraining syndrome in the athlete: current clinical practice*. Curr Sports Med Rep. 2014 Jan-Feb;13(1):45-51. doi: 10.1249/JSR.027. Review. PubMed PMID: 24412891.
15. Coutts, A. and Cormack, S.J. (2014) *Monitoring the Training Response*. In: *High-Performance Training for Sports*. Eds: Joyce, D. & Lewindon, D. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers. 71- 84.
16. Crítica, R. Características da periodização em esportes coletivos: uma revisão crítica., 5, 46–63. 2011
17. COUTTS, A. J. et al. *Changes in selected biochemical, muscular strength, power, and endurance measures during deliberate overreaching and tapering in rugby league players*. International Journal of Sports Medicine. 28(2): 116-124, 2007a.
18. Carla M. P. & F. S. Guilherme., Revisão, “*Características da periodização em esportes coletivos: uma revisão crítica*.”, 5 (2011), 46–63

19. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982 Aug 31;107(4):1198-205. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95. Review. PubMed PMID: 11773609.
20. Deldicque, Louise, Marc Francaux, e Jordan Mckenzie Glenn, “*Recommendations for healthy nutrition in female endurance runners: an update*”, 2 (2015), 1–7 <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2015.00017>
21. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1978 Dec;45(6):927-32.
22. Ednildes de Almeida Olympio Rua, Marcella Leite Porto, Jean Pierre Louzada Ramos, Breno Valentim Nogueira, Silvana dos Santos Meyrelles, Elisardo Corral Vasquez and Thiago de Melo Costa Pereira. *Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates.* 2014.
23. Fernandes AL, Lopes-Silva JP, Bertuzzi R, Casarini DE, Arita DY, et al. (2014) *Effect of Time of Day on Performance, Hormonal and Metabolic Response during a 1000-M Cycling Time Trial.* PLoS ONE 9(10): e109954. doi:10.1371/journal.pone.0109954
24. FLECK, S.J. & KRAEMER, W.J. *Fundamentos do treinamento de força muscular.* 2ª ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.
25. FORTEZA DE LA ROSA, C.A. *Treinamento desportivo: carga, estrutura e planejamento.* São Paulo: Phorte Editora, 2001.
26. Fox, E.L. ; Bowers, R.W.; Foss, M.L. *Bases Fisiológicas da Educação Física e dos Desportos.* 4a edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 1991.
27. GOMES, A. C. *Treinamento desportivo: estruturação e periodização.* Porto Alegre: Artmed, 2002.
28. Gonzalo Palacios, Raquel Pedrero-Chamizo, Nieves Palacios, Beatriz Maroto-Sánchez, Susana Aznar and Marcela González-Gross. *Biomarkers of physical activity and exercise, Nutr Hosp* 2015; 31(Supl. 3):237-244;
29. Heaney RP, Recker RR, Saville PD. *Menopausal changes in calcium balance performance.* *J Lab Clin Med* 1978; 92: 953-63 apud Aisenbrey JA. 1987

30. Homberg, S. and Papageorgiou, A. (1994) *Handbook for beach volleyball*. Meyer & Meyer Verlag.
31. Hug M, Mullis PE, Vogt M, Ventura N, Hoppeler H. *Training modalities: overreaching and over-training in athletes, including a study of the role of hormones*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jun;17(2):191-209. Review. PubMed PMID: 12787547.
32. Hulka BS. Overview of biological markers. In: *Biological markers in epidemiology* (Hulka BS, Griffith JD, Wilcosky TC, eds), pp 3–15. New York: Oxford University Press, 1990.
33. JM García Manso, M Navarro, JA Ruiz - Madrid: Gymnos, 1996
34. Kanaley JA, Weltman JY, Pieper KS, Weltman A, Hartman ML. Cortisol and growth hormone responses to exercise at different times of day. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun;86(6):2881-9.
35. Kocabaş R, Namiduru ES, Bağçeci AM, Erenler AK, Karakoç Ö, Örkmez M, Akan M, Erdemli HK, Taysi S, Tarakçioğlu M. *The acute effects of interval exercise on oxidative stress and antioxidant status in volleyball players*. *J Sports Med Phys Fitness*. 2016 Sep 22.
36. Künstlinger U, Ludwig HG, Stegemann J. *Metabolic changes during volleyball matches*. *Int J Sports Med*. 1987 Oct;8(5):315-22. PubMed PMID: 3679645.
37. LAMBERT, M. I.; BORRESEN, J. *Measuring training load in sports*. *Int J Sports Physiol Perform*, v. 5, n. 3, p. 406-11, Sep 2010
38. Lewis NA, Newell J, Burden R, Howatson G, Pedlar CR. *Critical Difference and Biological Variation in Biomarkers of Oxidative Stress and Nutritional Status in Athletes*. *PLoS One*. 2016 Mar 1;11(3):e0149927. doi: 10.1371/journal.pone.0149927.eCollection 2016.
39. Lippi G, Schena F, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. *Influence of acute physical exercise on emerging muscular biomarkers*. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(9):1313-8. doi: 10.1515/CCLM.2008.250.
40. Lopes, Charles Ricardo, “Análise das capacidades de resistência, força e velocidade na periodização de modalidades intermitentes”, 2005.
41. Mandell, MP & Keast, RL, 'Evaluating the effectiveness of interorganizational relations through networks: developing a framework for revised performance measures', *Public Management Review*, vol. 10, no. 6, pp. 715-731, 2008

42. Marinho, Paulo Cezar da Silva. *Sistema de periodização em blocos: efeitos de um modelo de treinamento sobre o desempenho de nadadores velocistas de alto nível*/ SP: [s.n], 2008
43. Mattson MP. *Hormesis defined*. *Ageing Res Rev*. 2008 Jan;7(1):1-7. Epub 2007 Dec 5. Review.
44. MATVEEV, L. P. *Treino Desportivo: metodologia e planeamento*. 1ª ed. Guarulhos: Phorte, 1997.
45. MATVÉIEV, L.P. *Fundamentos do treino desportivo*. Lisboa: Livros Horizontes, 1986.
46. Mayeux R. *Biomarkers: potential uses and limitations*. *NeuroRx*. 2004 Apr;1(2):182-8. Review. PubMed PMID: 15717018
47. Mazon J, Gastaldi A, Di Sacco T, Cozza I, Dutra S, Souza H. *Effects of training periodization on cardiac autonomic modulation and endogenous stress markers in volleyball players*. *Scand J Med Sci Sports*. 2013 Feb;23(1):114-20. doi: 10.1111/j.1600-0838.2011.01357.x.
48. McArdle W, Katch FI, Katch VLD. *Fisiologia do exercício – energia, nutrição e desempenho humano*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
49. McLeay Y, Stannard S, Houltham S, Starck C. Dietary thiols in exercise: oxidative stress defence, exercise performance, and adaptation. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017 Apr 27;14:12. doi: 10.1186/s12970-017-0168-9. eCollection 2017.
50. Medeiros A, Marcelino R, Mesquita I, Palao JM. *Physical and temporal characteristics of under 19, under 21 and senior male beach volleyball players*. *J Sports Sci Med*. 2014 Sep 1;13(3):658-65. eCollection 2014 Sep. PubMed PMID: 25177196
51. Meyer T, Meister S. Routine blood parameters in elite soccer players. *Int J Sports Med*. 2011 Nov;32(11):875-81. doi: 10.1055/s-0031-1280776. Epub 2011 Oct 21. PubMed PMID: 22020850.
1. MONTEIRO, Artur; LOPES, Charles. *Periodização Esportiva - Periodização do Treinamento*/ Artur Monteiro e Charles Lopes São Paulo: AG Editora, 2015. ISBN - 9 788590 704416 1. 2015
 2. Moreira A, Nakamura FY, Cavazzoni PB, Gomes JH, Martignago P. *O efeito da intensificação do treinamento na percepção de esforço da sessão e nas*

- fontes e sintomas de estresse em jogadores jovens de basquetebol. Rev Educ Fis* 2010; 21 (2) :287-96.
3. NAKAMURA, F.; MOREIRA, A.; AOKI, M. S. *Monitoramento da carga de treinamento: a percepção subjetiva de esforço da sessão é um método confiável?* R. da Educação Física/UEM, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2010
 4. Nassib S, Moalla W, Hammoudi-Nassib S, Chtara M, Hachana Y, Tabka Z, Chamari K, Elloumi M. The IGF-1/cortisol ratio as a useful marker for monitoring training in young boxers. *Biol Sport*. 2016 Mar; 33(1):15-22. doi: 10.5604/20831862.1180172. Epub 2015 Nov 19. PubMed PMID: 26985129; PubMed Central PMCID: PMC4786582.
 5. Nina Della. *Prevalência de anemia e sua associação com aspectos sociodemográficos e antropométricos em crianças de Vitória, Espírito Santo, Brasil, 2012*, www.scielo.br/pdf/csc/v18n11/17Nutr. 2017 Apr 27;14:12. doi: 10.1186/s12970-017-0168-9. eCollection 2017.
 6. Ostojic SM, Ahmetovic Z. Weekly training volume and hematological status in female top-level athletes of different sports. *J Sports Med Phys Fitness*. 2008 Sep;48(3):398-403. PubMed PMID: 18974729.
 7. Papacosta E, Nassis GP, Gleeson M. *Effects of acute postexercise chocolate milk consumption during intensive judo training on the recovery of salivary hormones, salivary SIgA, mood state, muscle soreness, and judo-related performance*. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015 Nov;40(11):1116-22. doi:10.1139/apnm-2015-0243. Epub 2015 Jul 20.
 8. Peeling, Peter, Marc Sim, Claire E Badenhorst, Brian Dawson, Andrew Dopus, Chris R Abbiss, et al., "Iron Status and the Acute Post-Exercise Hepcidin Response in Athletes", 9 (2014) <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093002>>
 9. Reinke S, Karhausen T, Doehner W, Taylor W, Hottenrott K, Duda GN, Reinke P, Volk HD, Anker SD. The influence of recovery and training phases on body composition, peripheral vascular function and immune system of professional soccer players. *PLoS One*. 2009.
 10. Pereira TM, Pimenta FS, Porto ML, Baldo MP, Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Coadjuvants in the Diabetic Complications: Nutraceuticals and Drugs with Pleiotropic Effects. *Int J Mol Sci*. 2016 Aug 5;17(8). pii: E1273. doi: 10.3390/ijms17081273. Review.

11. Porto ML, Rodrigues BP, Menezes TN, Ceschim SL, Casarini DE, Gava AL, Pereira TM, Vasquez EC, Campagnaro BP, Meyrelles SS. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *J Biomed Sci.* 2015 Oct 24;22:97. doi: 10.1186/s12929-015-0201-8. PubMed PMID:26498041;
12. Powers SK, Jackson MJ. *Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production.* *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1243-76. doi: 10.1152/physrev.00031.2007. Review. PubMed PMID: 18923182
13. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. *Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle.* *Compr Physiol.* 2011 Apr;1(2):941-69. doi: 10.1002/cphy.c100054. Review.
14. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 2011 Apr;1(2):941-69. doi: 10.1002/cphy.c100054. Review.
15. Powers SK, Radak Z, Ji LL. Exercise-induced oxidative stress: past, present
16. Pyne DB. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med.* 1994
17. REID B. MICHAEL. *REACTIVE OXYGEN SPECIES AS AGENTS OF FATIGUE.* *Medicine & Science in Sports & Exercise,* 2016.
18. Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol* (1985). 1992
19. Reid MB. Reactive Oxygen Species as Agents of Fatigue. *Med Sci Sports Exerc.* 2016 Nov;48(11):2239-2246.
20. Reinke S, Karhausen T, Doehner W, Taylor W, Hottenrott K, Duda GN, Reinke P, Volk HD, Anker SD. The influence of recovery and training phases on body
21. RESENDE, Nathália Maria. *Análise metabólica e metabolômica de atleta olímpico: Uma nova proposta para um nexus bioquímico.* 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
22. Russell M, Birch J, Love T, Cook CJ, Bracken RM, Taylor T, Swift E, Cockburn E, Finn C, Cunningham D, Wilson L, Kilduff LP. *The Effects of a Single Whole-Body Cryotherapy Exposure on Physiological, Performance, and Perceptual Responses of Professional Academy Soccer Players After Repeated Sprint*

- Exercise.* J Strength Cond Res. 2017 Feb;31(2):415-421. doi: 10.1519/JSC.0000000000001505.
23. Mountjoy M, Budgett R, Engebretsen L. Sports injuries and illnesses in the Sochi 2014 Olympic Winter Games. Br J Sports Med. 2015 Apr;49(7):441-7. doi:10.1136/bjsports-2014-094538.
24. Ryu JH, Paik IY, Woo JH, Shin KO, Cho SY, Roh HT. Impact of different running distances on muscle and lymphocyte DNA damage in amateur marathon runners. J Phys Ther Sci. 2016 Jan;28(2):450-5. doi: 10.1589/jpts.28.450. Epub 2016 Feb 29. PubMed PMID: 27065529.
25. Salles, Nilton, Rosa Neto, e Jozélio Freire De Carvalho, "ARTIGO DE REVISÃO O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia", 49 (2009)
26. Sanchis-Gomar F, Lippi G. *Physical activity - an important preanalytical variable.* Biochem Med (Zagreb). 2014 Feb 15;24(1):68-79. doi: 10.11613/BM.2014.009. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 24627716; PubMed Central PMCID: PMC3936967.
27. Schwellnus M, Soligard T, Alonso JM, Bahr R, Clarsen B, Dijkstra HP, Gabbett
28. SILVA, F.M. *A necessidade de novas elaborações teórico - metodológicas para o treino desportivo: Uma realidade que se impõe. Revista Horizonte, v. XIII, n. 76, mar./abr, 1997.*
29. SILVA, F.M. *Planejamento e periodização do treinamento desportivo: mudanças e perspectivas.* In: *Treinamento desportivo: reflexões e experiências.* João Pessoa: Editora Universitária, p. 29-47, 1998.
30. SILVA, F.M. *Para uma nova teoria da periodização do treino - Um estudo do atletismo português de meio-fundo e fundo.* Tese de doutorado, 359p. Faculdade de Ciências do Desporto e da Educação Física - Universidade do Porto, 1995.
31. Sjödín B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med. 1990 Oct;10(4):236-54.
32. Smith DJ, Roberts D, Watson B. *Physical, physiological and performance differences between Canadian national team and universiade volleyball players.* J Sports Sci. 1992 Apr;10(2):131-8. soccer players. PLoS One. 2009;4(3):e4910. doi: 10.1371/journal.pone.0004910.
33. Soligard T, Steffen K, Palmer-Green D, Aubry M, Grant ME, Meeuwisse W,

34. Thorpe RT, Atkinson G, Drust B, Gregson W. Monitoring Fatigue Status in Elite Team-Sport Athletes: Implications for Practice. *Int J Sports Physiol Perform.* 2017 Apr;12(Suppl 2):S227-S234. doi: 10.1123/ijsp.2016-0434.
35. TJ, Gleeson M, Hägglund M, Hutchinson MR, Janse Van Rensburg C, Meeusen R, Orchard JW, Pluim BM, Raftery M, Budgett R, Engebretsen L. How much is too much? (Part 2) International Olympic Committee consensus statement on load in sport and risk of illness. *Br J Sports Med.* 2016 Sep;50(17):1043-52. doi:10.1136/bjsports-2016-096572.
36. Tokarska-Schlattner M, Epand RF, Meiler F, Zandomeneghi G, Neumann D, Widmer HR, Meier BH, Epand RM, Saks V, Wallimann T, Schlattner U. Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects. *PLoS One.* 2012;7(8):e43178. doi: 10.1371/journal.pone.0043178. Epub 2012 Aug 17.
37. TSCHIENE, P. Il ciclo annuale d'allenamento. *Revista di Cultura Sportiva*, ano IV, n. 2, p. 16-21, 1985.
38. TUBINO, M.J.G. *Metodologia científica do treinamento desportivo*. 3.ed., São Paulo: Ibrasa, 1984.
39. VERCHOSANSKIJ, I.V. *Principios de entrenamiento para atletas de elite*. *Revista Stadium*, n. 99, p. 3-8, 1983.
40. VERCHOSANSKIJ, I.V. *Principios de entrenamiento para atletas de elite*. *Revista Stadium*, n. 99, p. 3-8, 1983.
41. VIRU A. Mechanism of general adaptation. *Medical Hypotheses.* 38 (4):296--300, 1992.
42. VIRU, A. *Adaptations in sports training*. London: Informa Health Care, 1995.
43. VIRU, A.; VIRU, M. *Biochemical monitoring of sport training* Champaign: *Human Kinetics*, 2001.
44. VIRU, A.; VIRU, M. *Nature of training effects*. In: GARRET, W. E.; KIRKENDALL, D. T. (Org.). *Exercise And Sport Science*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 67---95.
45. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.* 2005;35(12):1045-62.

46. Volllaard NB, Shearman JP, Cooper CE. *Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance*. Sports Med. 2005;35(12):1045-62.
47. Wojtys EM. *Sports Specialization vs Diversification*. Sports Health. 20 May;5(3):212-3. doi: 10.1177/1941738113484130.
48. Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. *Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants*. Asian J Sports Med. 2015 Mar;6(1):e24898. doi: 10.5812/asjasm.24898. Epub 2015 Feb 20. Review. PubMed PMID: 25883776;
49. ZAKHAROV, A. & GOMES, A.C. *Ciência do treinamento desportivo*. Rio de Janeiro: Grupo Palestra Sport, 1992.

ANEXOS

ANEXO I Tabela de marcadores convencionais

ANEXO II Paper

	PARAMETERS	T0		T1		T2		T3		T4		T5		T6		T7		T8		Mean - SD		Interval Adults
		AC	BS	AC	BS																	
CONVENTIONAL	Lactate (mmol/L)	1.1	2	1.12	1	2	2.5	1.8	1.7	1.9	0.9	1.1	0.8	1.4	1.5	1.2	1.2	2	0.7	1.51±0.13	1.36±0.20	0.7-2.1
	LDH (U/L)	308	387	317	366	328	396	305	365	325	342	274	339	368	411	322	370	323	298	322±12.24	366±11.35	313-618
	CK (U/L)	124	147	210	278	182	245	92	315	232	224	101	176	215	215	215	264	145	132	182±17.95	224±20.40	55-170
	CK-MB (U/L)	11	13	3	13	14	11	13	15	13	14	12	16	16	16	16	13	20	13	13±1.50	13±0.54	≤24
	T/C	25.55	44.19	32.94	47.50	42.13	73.03	61.85	32.25	24.50	39.13	30.18	41.34	35.28	53.63	69.99	87.59	27.13	40.65	38.86±5.46	51.03±5.98	-
	IGF-1/cortisol ratio	0.66	2.92	0.52	3.06	0.97	3.45	1.29	2.51	0.53	1.78	0.69	2.43	1.42	3.00	1.6	3.79	0.58	2.36	0.64±0.13	2.51±0.22	-
SUPPLEMENTARY	CT (mg/dL)	196	172	193	142	186	160	187	148	182	151	189	161	171	141	169	148	170	132	186±3.41	148±4.04	<200
	HDL (mg/dL)	49	50	49	50	49	57	56	52	49	53	55	56	47	49	48	57	55	49	49±1	52±1	≥40
	NAO HDL (mg/dL)	147	122	144	92	137	103	131	96	133	98	113	84	95	68	99	72	91	63	131±7	92±6	≤100
	TG (mg/dL)	100	138	87	87	94	68	50	108	100	60	72	74	136	91	77	81	92	69	92±8	81±8	<150
	Glucose (mg/dL)	88	82	79	95	86	87	86	81	74	88	92	86	89	89	86	85	89	82	86±1	86±1	65-99
	Insulin (µU/mL)	6	10	5	7	5	5	4	8	5	8	8	7	6	9	5	6	13	9	5±0.93	8±0.49	3-25
	HOMA IR	1.48	1.96	0.53	1.61	0.97	1.09	1.35	1.69	1.25	1.69	0.98	1.59	1.09	1.91	1.29	1.27	1.12	1.82	1.12±0.09	1.62±0.09	<3
	TSH (µU/mL)	1.94	1.12	2.02	0.99	2.07	0.67	2.54	1.16	3.38	1.37	1.7	0.87	1.03	0.86	1.03	0.77	2.44	0.81	2.01±0.24	0.95±0.07	0.34-5.6
	Free T4 (ng/dL)	0.94	0.71	0.74	0.72	0.70	0.84	0.87	0.84	0.79	0.73	0.80	0.89	0.87	0.87	0.87	0.86	0.81	1.38	0.82±0.02	0.87±0.06	0.61-1.42
	Cortisol (µg/dL)	18	12	20	10	12	8	8	14	18	13	18	12	9	9	8	7	19	11	18±0.72	11±0.79	5-25
	GH (ng/mL)	0.04	0.12	0.01	0.23	0.19	0.34	1.11	0.13	0.13	0.16	0.09	0.13	0.30	0.11	0.30	0.32	0.07	0.18	0.13±0.11	0.16±0.02	≤3
	IGF-1 (ng/mL)	118	350	104	306	116	276	103	351	95	232	125	291	128	270	128	265	111	260	116±3.95	276±13.46	117-329
	Testosterone (ng/dL)	453	539	665	484	489	584	482	445	496	497	552	496	314	488	553	578	505	463	496±31.81	496±16.18	200-1100
	Progesterone (ng/mL)	0.82	0.86	0.58	0.34	0.62	0.31	0.51	0.81	1.03	0.87	1.09	0.77	0.24	0.40	0.31	0.45	1.38	0.36	0.62±0.12	0.45±0.08	0.2-1.5
	AST (U/L)	27	27	31	31	24	26	20	30	22	25	17	26	28	29	17	28	21	22	22±1.63	27±0.01	5-45
	ALT (U/L)	29	23	42	24	29	37	26	31	23	20	21	22	27	25	21	25	26	21	26±2.11	24±1.80	7-56
GGT (U/L)	25	17	29	11	22	19	22	14	16	10	15	13	16	13	14	14	18	12	18±1.70	13±0.94	8-78	
Alpha-amylase (U/L)	54	56	51	59	57	59	57	53	60	62	56	62	50	58	56	45	66	61	56±1.59	59±1.80	20-110	
Blood urea (mg/dL)	43	41	36	45	28	36	49	47	41	39	39	41	28	30	39	34	32	36	39±2.33	39±1.76	15-44	
Creatinine (mg/dL)	1.1	1	1.2	1	1.2	1	1.1	1.1	1.1	1	1.1	1.1	1.2	1.1	0.9	0.9	1.3	0.9	1.1±0.03	1±0.02	0.8-1.5	

Na⁺ (mEq/L)	136	137	138	136	137	139	138	136	138	137	138	137	137	139	137	137	140	139	138±0.37	137±0.41	137-145
K⁺ (mEq/L)	3.9	4.1	4.1	4.3	4.5	4.2	4.3	4.1	4.3	4.2	4.5	4.1	4.3	4.3	4.3	4.4	4.3	4.0	4.3±0.06	4.2±0.04	3.6-5
Total Ca⁺⁺ (mg/dL)	9.9	9.8	10.1	9.2	9.6	9.7	9.9	9.5	9.4	9.4	9.5	9.7	9.7	9.7	9.5	9.7	9.5	9.2	9.6±0.07	9.7±0.07	8.4-10.2
Total Mg⁺⁺ (mg/dL)	2.0	2.2	2.1	2.2	2.1	2.0	2.1	2.2	2.0	2.1	1.8	1.9	1.9	2.1	1.9	2.0	1.9	2.1	2±0.03	2.1±0.03	1.3-2.1
Fe⁺⁺ (µg/dL)	94	142	121	82	123	71	127	132	144	80	143	87	65	83	119	122	83	110-	121±8.99	85±8.64	49-181
Ferritin (ng/mL)	170	151	137	102	131	100	130	136	160	138	133	147	184	152	107	110	117	133	133±8.37	136±6.88	18-464
PCR (mg/L)	0.43	0.97	1.31	0.22	0.46	0.27	0.96	0.91	0.44	0.30	0.39	0.19	0.90	0.29	0.30	0.19	1.36	2.62	0.46±0.13	0.29±0.26	<5
Red Blood Cell (RBC) Count (10⁶/mm³)	5.15	5.29	4.86	4.95	4.91	5.10	4.98	5.26	4.72	5.03	5.01	5.03	5	4.94	4.84	5.19	5.11	4.98	4.95±0.04	5.08±0.04	4.32-5.52
Hemoglobin (g/dL)	15	16	15	15	15	16	15	16	15	15	16	15	15	15	15	16	16	15	15±0.15	15±0.14	13-16
Hematocrit (%)	48	49	44	46	45	47	46	49	44	47	47	47	48	46	45	48	48	46	46±0.54	47±0.43	38-50
Mean Corpuscular Volume (MCV)	93	92	91	92	93	93	92	93	94	93	94	94	95	92	96	92	95	91	94±0.52	92±0.28	87-103
Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH)	31	31	31	32	31	32	31	31	32	31	32	31	32	31	31	30	32	31	31±0.16	31±0.15	26-34
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)	33	34	34	34	33	34	34	34	34	34	34	33	33	33	34	34	34	34	34±0.12	34±0.12	32-37
RDW (%)	12.31	12.74	12.85	12.75	12.49	13.14	12.86	13.14	12.63	12.56	12.40	12.62	11.48	12.56	12.35	13.01	12.47	12.92	12.43±0.13	12.83±0.07	11.5-15
White Blood Cell (WBC) Count (10³/mm³)	4.99	4.57	5.0	4.57	3.84	4.72	4.99	6.75	3.65	5.64	3.66	5.26	4.87	5.04	3.64	5.04	6.19	6.91	4.87±0.29	5.04±0.29	5-10
Band neutrophils (%)	2	2	2	2	3	1	1	2	3	1	3	2	3	3	2	1	2	1	2±2.65	2±2.43	0-1
Segmented Neutrophils (%)	49	49	49	50	50	62	50	47	40	43	45	54	69	57	50	52	55	66	50±2.42	52±0.23	40-65
Eosinophils (%)	3.3	3.3	3.0	4.0	2.7	2.0	5.5	0.5	3.4	3.5	3.9	3.7	1.6	2.8	2.4	2.5	3.2	2.0	3.2±0.35	2.8±0.36	1-5
Lymphocytes (%)	37	37	37	36	36	28	36	36	46	45	41	33	18	31	37	37	32	24	37±2.56	36±2.04	20-5-
Monocytes (%)	8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	7	6	9	5	8	7	7	7	7±0.22	7±0.30	0-12
Basophils (%)	0.59	0.56	0.72	0.56	0.70	0.51	0.85	0.56	0.60	0.38	0.40	0.43	0.48	0.58	0.37	0.51	0.55	0.47	0.58±0.05	0.50±0.02	0-2
Platelet Count (10³/mm³)	201	170	227	145	214	168	208	167	199	162	192	151	174	186	192	166	222	178	201±5.46	167±4.14	150-350

Non-conventional and conventional biomarkers evaluated in gold medalists beach volleyball players during the 2015 and 2016 seasons (pre-Olympic and Olympic years)

Helvio Oliveira Affonso^{1,2}, Francisco Leandro Andreão², MarcellaL Porto³, Silvana Santos Meyrelles³, ElisardoC Vasquez^{1,4}, Marcelo P Baldo⁵, Bianca Prandi Campagnaro¹, Thiago M C Pereira^{1,3§}

¹Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University (UVV), Vila Velha, ES, Brazil

²Appto Physiology, Laboratory of Exercise, Nutrition and Sports Training, Espirito Santo, Vitoria, Brazil

³Federal Institute of Education, Science and Technology (IFES), Vila Velha, ES, Brazil

⁴Laboratory of Translational Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, Brazil

⁵Department of Pathophysiology, Montes Claros State University - UNIMONTES, Montes Claros, MG, Brazil
Emails:

HOA: hoaffonso@gmail.com

FLA: brachola@hotmail.com

MLP: cella.porto@gmail.com

SSM: meyrelle.vix@terra.com.br

ECV: evasquez@terra.com.br

MPB: marcelobaldo@ymail.com

[§]Corresponding author: Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University (UVV), Av.

Comissario Jose Dantas de Melo 21, 29102-920, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brazil

E-mail address: pereiratmc@gmail.com

Running title: *Biomarkers in Olympic beach volleyball players*

Abstract

Background: Although biomolecules are fundamental to diagnosis, prognosis and screening of several diseases, only in the last decades some biomarkers have emerged a tool in elite sports, there is still a void in elite beach volleyball (BV) athletes. As the reference values for serum biomarkers of elite BV athletes is still unknown, these parameters may partially contribute to misinterpretation culminating with inadequate decisions by the staffs, as observed in other modalities. Then, it is interesting to know the profile of biomarkers of elite BV athletes to optimize the periodization process and performance of athletes.

Aims of the study: To evaluate the levels of non-conventional and conventional biomarkers in elite BV athletes during the pre-Olympic and Olympic years.

Methods: This prospective and observational study included 2 Olympic adult beach volleyball players during 2015 and 2016 seasons which were divided into three blocks: A) general or introductory adaptation (under endurance training); B) accumulation of force and transition of force/power (under

strength training) and C) power (competitive target periods - most important competitions). Along the seasons, strength and power were monitored by a computerized digital dynamometer. In addition, blood samples were collected between at 48h post-match or post-block. Finally, the non-conventional (leukocyte ROS production and apoptosis/necrosis index) and conventional biomarkers (48 parameters) were analyzed.

Results: Both serum leukocyte ROS and apoptosis/necrosis index of BV athletes increased in periods of intense exercise activity ('accumulation' and 'competition' periods) compared with 'restitution' or 'pre-season' periods. However, among all the conventional biomarkers, only CK showed values above the normal reference mainly in periods of intense exercise activity. In relation to anabolic/metabolic metabolism, IGF-1/Cortisol ratio showed better profile than Testosterone/Cortisol ratio of BV athletes.

Conclusion: Our findings suggest that non-conventional markers (leukocyte ROS production and apoptosis/necrosis) associated to IGF-1/cortisol ratio could be sensitive biomarkers during the BV seasons to follow the performance of the players in substitution to conventional serum biomarkers. These parameters may help prevent possible states of overtraining and injuries, opening a new avenue for optimizing the performance monitoring of elite BV athletes.

Keywords: *physical exercise, biomarker, oxidative stress, ROS production, apoptosis, overtraining, CK, IGF-1/cortisol ratio*

1. Introduction

The biomarkers can be defined as biochemical or cellular alterations which are frequently quantified in fluids, such as blood serum, urine or saliva [Hulka, 1990; Mayeux, 2004]. Although several biomolecules provide a dynamic approach to diagnosis, prognosis and screening of several diseases, only in the last decades some biomarkers have emerged as an interesting tool in sports. Generally, they have been used to monitor progress in training, performance and, possibly, overtraining between athletes of several modalities [Hug et al., 2003; Sanchis-Gomar and Lippi, 2014; Palacios et al., 2015; Becatti et al., 2017; Thorpe et al., 2017]. Despite this increase in interest in biomarkers, there are still few studies with volleyball players [Mazon et al., 2013; Kocabaş et al., 2016].

Previous physiological studies have demonstrated that the volleyball is a team sport (referred to as the world's 5th most popular) with aerobic and anaerobic components, characterized by glycogenolysis and lipolysis accompanied by high-intensity of court movement (e.g., blocks and spikes), respectively [Kunstlinger et al., 1987; Smith et al., 1992]. More intensely, beach volleyball (BV) is a subtype of this sport constituted by brief periods of maximal activity to longer periods of moderate and low intensity activity [Homberg, 1994;

Medeiros et al., 2014]. More specifically, there are still no consistent data demonstrating the applicability of biomarkers to BV players.

As the reference values for blood levels of biomarkers of athletes of BV remains unknown, these isolated parameters solicited by sport physicians may partially contribute to misinterpretation of the results culminating with inadequate decisions by the staff in professional BV, as observed in other modalities [Banfi et al., 2012; Lewis et al., 2016; Becatti et al., 2017]. In this context, even though it is a challenge in many different sports, it is relevant to know reference values of BV athletes for a better understanding of training response and to optimize the periodization process.

In parallel, recent evidences have shown that intensive training periods can trigger a high reactive oxygen species (ROS) production by cells [Vollaard et al., 2005; Yavari et al., 2015; Reid, 2016; Becatti et al., 2017]. Interestingly, while many studies have reported that ROS are involved in muscle damage and chronic fatigue, others have suggested that low levels of ROS are fundamental to a protective role in exercise-induced adaptations [Mattson, 2008; McLeay et al., 2017; Becatti et al., 2017]. However, this exact bioavailability of ROS that may enhance the performance without compromise adaptive pathways still needs to be elucidated [Powers et al., 2011; McLeay et al., 2017]. Thus, monitoring ROS levels in BV athletes also might be an innovative tool to predict risk of injury or overtraining.

Thus, the objective of this study was to analyze the levels of non-conventional and conventional biomarkers in elite BV athletes during the 2015 and 2016 seasons (pre-Olympic and Olympic years). These data may identify a novel approach for optimizing the performance monitoring of BV athletes.

2. METHODS

2.1 Subjects

This prospective and observational study included 2 Olympic adult beach volleyball players (30 years of age), without exclusion criteria. This study conducted between 10 January 2015 and 24 August 2016 was approved by the Brazilian Ethical Committee for human research 'Plataforma Brasil' (#1.540.498). They were informed about the investigation, and they gave their written informed consent to participate. None of the athletes contracted infectious diseases or received any supplementation/ medication that might modify the observed results.

2.2 Periodization of training

The periodization of training was divided into the following three blocks: A) general or introductory adaptation (under endurance training); B) accumulation of force and transition of force/power (under strength training) and C) power (competitive target periods - most important competitions), all of these always interspersed with periods of recovery between the respective blocks. During all the cycle, it was aimed at the maintenance of high force and power due to high number of competitions throughout the cycle pre-Olympic and Olympic.

2.3 Evaluation of strength and power

The data of strength and power were monitored by a computerized digital dynamometer (Peak Power, CEFISE®, Nova Odessa, São Paulo, Brazil) connected to a bar. This equipment emits an electric signal with each revolution realized. Since the distance traveled between two emitted signals is known, displacement of the bar is obtained. Through this protocol, the parameters obtained were absolute power (watts) and maximum strength (Kgf) developed throughout the concentric phase of the "half squat" exercise at a frequency of 50 Hz.

2.3.1 The one repetition maximum (1RM) test

The BV athletes warmed up prior to testing by cycling for 10 to 20 minutes with static stretching and myofascial release. After 5 minutes of rest period, the BV players were familiarized with each of the resistance machines (Peak Power, CEFISE®, Nova Odessa, São Paulo, Brazil) by performing 8-10 repetitions of a light load (~50% of predicted 1RM). After more 5 minutes of rest, they performed a load (~80% of estimated 1RM) through the single leg half squatting. After each successful performance, the weight increased until a failed attempt occurred. One minute rests were given between each attempt and the 1-RM was attained within 5 attempts and 5 minutes rest separated each test. All 1RM measurements were reported in kilograms for subsequent data analysis.

2.3.2 Power Test

The athletes were evaluated in high speed half squat, with emphasis on the execution of the concentric component (high speed climb), isolating the eccentric component (slow descent with a rapid stop isometry before the concentric phase /climb). The positioning of the

feet was determined with areas marked on the ground. After the physical trainer command, athletes were submitted to six repetitions of the 'high speed half squat' with 60% of load; 70%; 80% and 90% of 1 RM (pre-determined), interspersed for 5 minutes apart. Finally, the best relative power produced was recorded.

2.4 Blood samples

All blood samples were collected between at 48h post-match or post-block, excluding the influence of acute exhaustive exercise. Between 9 and 10 a.m., the blood samples were collected from the antecubital vein (in a seated position) in EDTA-containing Vacutainer glass tubes (Becton, Dickinson and Co, Franklin Lakes, NJ) and centrifuged at 2,000 g for 10 min; the serum was then stored at -20°C . All of the measurements were obtained via automatic biochemical analyzer (AU 680, Olympus/Beckman Coulter, Munich, Germany) or hematological analyzer (Coulter LH 750, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

2.5 Measurement of ROS production in the blood

An aliquot of the blood sample were transported to the laboratory of Translational Physiology (UFES) and analyzed not < 24 h from the time of collection. Then, the blood ROS were quantified by flow cytometry as previously reported [Porto et al., 2015; Almeida et al., 2016]. EDTA-anti-coagulated blood (100 μL) was resuspended in 2 mL of BD FACS Lysing Solution (Becton–Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), gently mixed, and incubated at RT in the dark for 30 min, following manufacturer's protocol. Next, cells were centrifuged, supernatant discarded and cells washed twice in PBS. To estimate the intracellular superoxide ($\bullet\text{O}_2^-$) or hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration, the dihydroethidium (DHE, 160 μM) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF, 20 mM) were respectively added to the cell suspension (10^6 cells) and incubated at 37°C for 30 min in the dark. Highly reactive oxygen species (hROS), such as peroxynitrite and hydroxyl radical, were selectively detected by 2-[6-(4'-hydroxy) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid (HPF). Then, the cells were washed, resuspended in PBS and analyzed through a flow cytometer (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA). The sample flow rate was adjusted to about 1000 cells/s. All the data were obtained using the FACSDiva software (BD) and overlay histograms were evaluated using FCS Express software trial (De Novo). For the quantification of DHE, DCF and HPF fluorescence, 10,000 leukocytes were used for each measurement in monoplicate with excitation occurring at 488 nm. The DHE fluorescence was measured at excitation/emission wavelength of 585/42 nm bandpass filter, and DCF or HPF fluorescence

was detected using a 530/30 nm bandpass filter. Finally, the data are expressed as the median fluorescence intensity (MFI).

2.6 Measurement of apoptosis/necrosis

Apoptotic/necrotic leukocyte cells were quantified by annexin V-FITC and PI double staining using an annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences, San Jose, CA). In brief, the leucocyte cells were washed twice with PBS and adjusted to 500 μ L of the binding buffer (5×10^5 cells). Then, the cell suspensions were incubated with annexin V-FITC and PI for 15 min at room temperature (25°C) in the dark. Finally, cells were analyzed with a FACSCanto II (BD) flow cytometer. Viable cells with positive staining for annexin V (Q1+Q2) were considered apoptotic/necrotic cells.

2.7 Quality of Analysis

As this study is descriptive, no statistical analysis was performed in a large part of the study. When appropriated, t-test was applied. Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance was set at $p < 0.05$. All data were processed using the Graph Pad Prism 5 software.

3. Results

Subjects

3.1 General characteristics

The anthropometric characteristics of athletes during the 2015 and 2016 seasons (pre-Olympic and Olympic years) are summarized in Table 1. Interestingly, although they exhibit similarities in ethnicity, age, body fat and lean mass their distinct physical structures (height, weight, BMI) induce them to assume fixed functions during all games (AC: attack and block player and BS: defensive player).

Table 1. Anthropometric characteristics of the elite beach volleyball players

Parameters	AC	BS
Race/Ethnicity	White	White
Age (Years)	30	30
Height (cm)	202	185

Weight (Kg)	113.5 (112.4-116.4)	90(88.8-91.2)
Body mass index (Kg/m ²)	27.9 (26.7-28.2)	26.3(25.9-26.6)
Body Fat Percentage	12(9.33-15.35)	11(8.97-12.39)
Lean mass Percentage	88(84-90.6)	89(87.6-91.3)

3.2

*Training**load measurements*

The performance of BV athletes is strongly associated with strength-power parameters. These data were routinely recorded in each block of periodization. The Figure 1 demonstrates the success of similar profile of strength (A) and power (B) between these elite athletes during pre-Olympic (2015) and Olympic (2016) seasons. As desired intentionally, the strength and power indexes increased in the first accumulation periods remaining stable, appearing all points higher than the competitive athletes (~3-fold and ~2-fold respectively) and amateur athletes (~10-fold and ~4-fold, respectively), as demonstrated in Figure C.

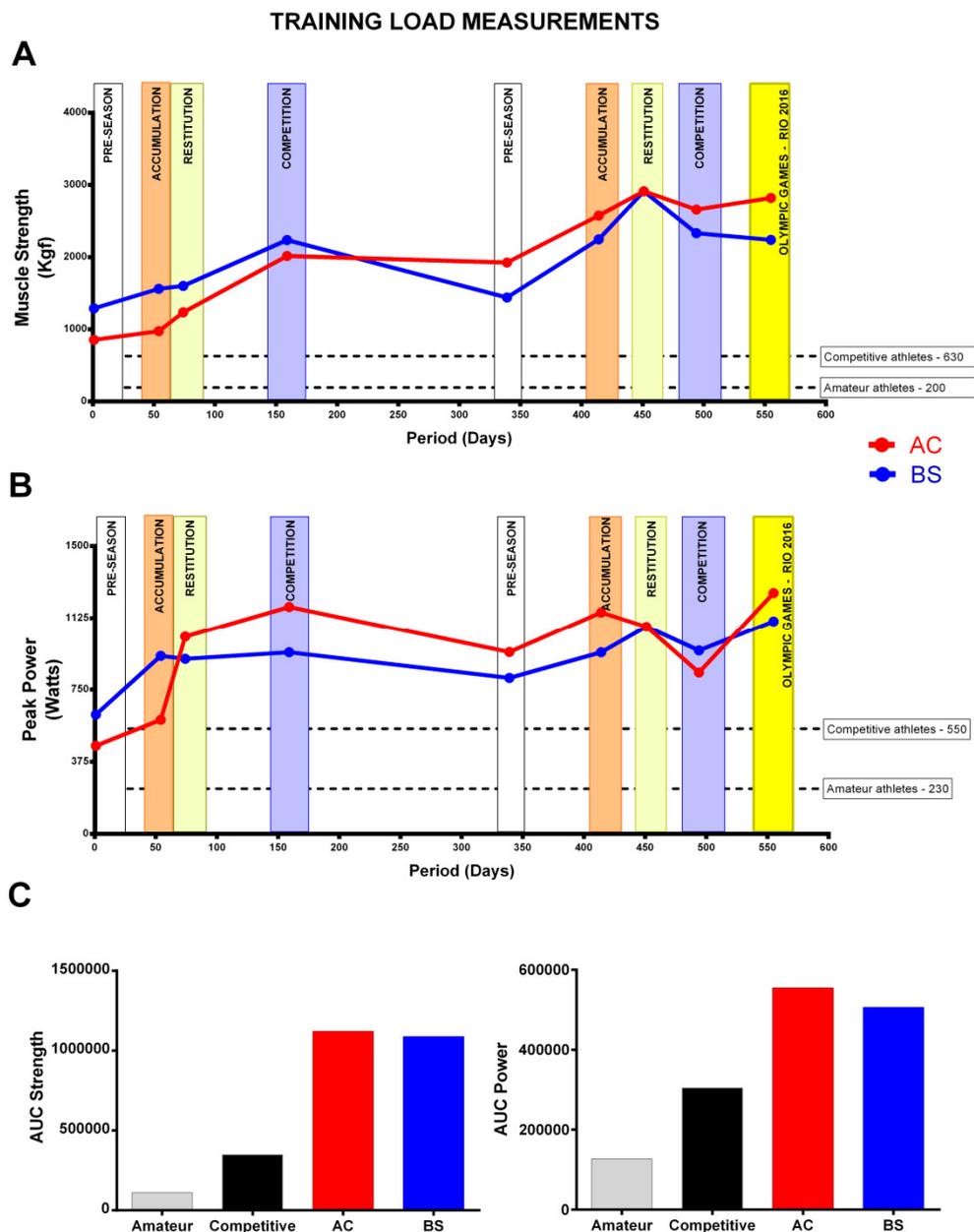


Figure 1. Strength (A) and power (B) profiles evaluated in gold medalists beach volleyball players. As desired, both indexes increased in the first accumulation periods remaining stable during the 2015 and 2016 seasons. C) Bar graphs showing the area under curve (AUC) of strength and power in comparison with amateur or competitive athletes.

3.3 Non-conventional biomarkers: ROS and apoptosis measurements

Based on previous data showing that skeletal muscle provides the major source of ROS generation during exercise with possible alterations in blood [Powers and Jackson, 2008; Powers et al., 2011; McLeay et al., 2017; Becatti et al., 2017], we evaluated for the first time the intracellular leukocyte ROS levels in elite BV players. As demonstrated in Figure 2A,

we observed that in both athletes the main increments of white blood cells ROS bioavailability occurred in periods of intense exercise activity ('accumulation' and 'competition' periods) with an increase of approximately 7 or 13- fold compared with 'restitution' or 'pre-season' periods, respectively. Among the ROS evaluated, the alterations of $\bullet\text{O}_2^-$ between periods was more evident compared to H_2O_2 or hROS.

When assessing the rate of apoptosis + necrosis index in the same samples (Figure 2B), we noted that its main increments followed the profile of the ROS production also in both athletes, reaching the highest indices in periods of competition.

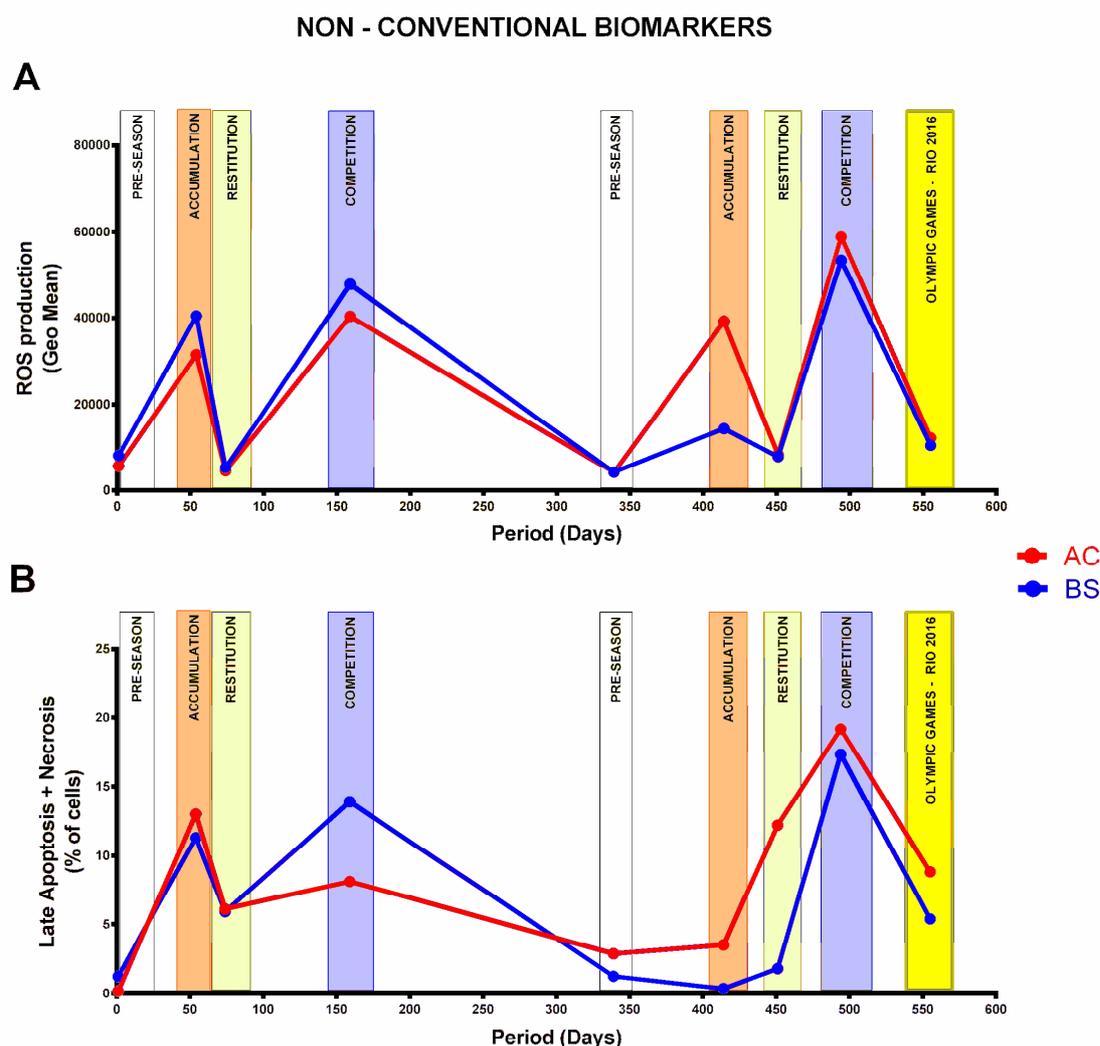


Figure 2. Evaluation of non-conventional biomarkers through of (A) blood ROS production and (B) late apoptosis + necrosis in gold medalists BV players during the pre-Olympic and Olympic seasons.

3.4 Conventional biomarkers evaluated

In our longitudinal study, we analyzed a total of 48 conventional biomarkers as potentially relevant for regular monitoring of athletes. Among them, we demonstrated in

Figure 3 the main biomarkers explored currently in sport medicine. In Figure 3A and B, we noted in both elite athletes that serum lactate and lactate dehydrogenase did not show any relevant modification during the different stages of periodization, revealing values compatible with those of reference for non-athletes throughout the seasons.

In relation to serum creatine kinase (CK) (Figure 3C), we showed that the values of the BS were higher than the respective clinical reference in ~95% of the seasons, mainly in periods of intense exercise activity ('accumulation' and 'competition' periods). However, AC did not demonstrate similar profile, revealing high values only in ~ 40% along the cycle and independent of periods of intense exercise activity. In Figure 3D, the serum levels of CK-MB (an isoform of CK) were similar between athletes and kept below the maximum clinical reference value during all the cycle.

In addition to the classical conventional biomarkers, we also evaluated two hormone ratios currently explored in sports medicine to evaluate anabolic/catabolic status: testosterone/cortisol (T/C) [Papacosta et al., 2015; Russell et al., 2017] and insulin growth factor/cortisol (IGF-1/C) [Nassib et al., 2016], represented by figures 3E and 3F, respectively. Although the absolute values are not equal, the profile of the curves presents a similar profile, indicating a predominance of anabolism in the Olympic phase (2016 - after 350 days) compared to pre-Olympic phase.

The remaining 42 parameters are shown in supplementary data related to this article (Supplementary Data 1).

CONVENTIONAL BIOMARKERS

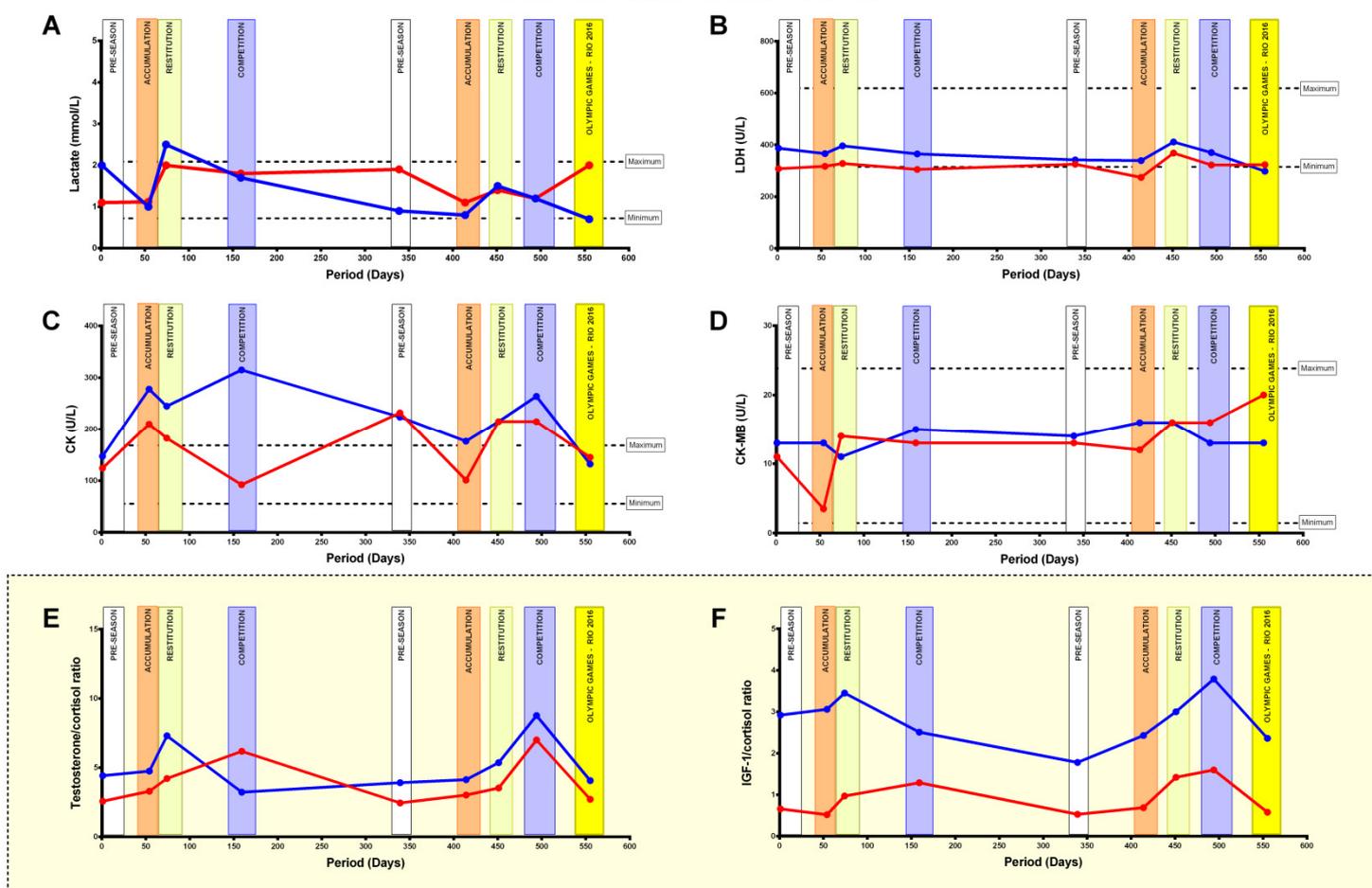


Figure 3. Measurement of conventional biomarkers in elite BV players during pre-Olympic and Olympic years. A) Analysis of serum lactate and B) lactate dehydrogenase showing a flat profile. C) Evaluation of creatine kinase (CK), demonstrating predominance in BS versus AC while in D) the isoform CK-MB shows similar between athletes. In yellow box, is demonstrated a similar profile between anabolic/catabolic hormone ratios: E) T/C (testosterone/cortisol) and F) IGF-1/C (insulin growth factor/cortisol).

4. Discussion

Although this study is performed by analyzing only 2 athletes (a complete BV team), we had an unprecedented opportunity to investigate the profile of levels of non-conventional and conventional biomarkers in elite BV players during 2 consecutive seasons (pre-Olympic and Olympic years), culminating in the conquest of Olympic gold medal in Rio 2016. Therefore, these data might open new strategies of research on sports medicine, especially for optimize the performance monitoring of BV athletes. Some implications as well as potential alternative hypotheses of these results are discussed below.

Currently, it is known that the Olympic athletes are submitted daily to an excessive training added to a stressful and congested calendar, might compromise the performance, increase risk of injuries and paradoxically lose their important competitions [Winsley and Matos, 2011; Soligard et al., 2015; Schwellnus et al., 2016; Thorpe et al., 2017]. Interestingly, our study with BV athletes describes a typical case. In the pre-Olympic period (2015), there were several tournaments throughout the year that demanded great results so that the BV athletes could participate in the Olympics in the next year. Therefore, in that scenario, there were two challenges for the staffs: 1) to maintain optimum performance (strength and power) throughout the seasons to achieve their goals as well as 2) remain the BV athletes free of injuries during these 2 years. Fortunately, both goals were achieved through the exploration of uncommon individualized loads and monitoring with non-conventional biomarkers (leukocyte ROS and apoptosis/necrosis index). Interestingly, we noted that the profile of strength and power was similar between these elite BV players during 2 seasons (Figure 1), demonstrating a relevant success of proposed load adaptation as well as the interpretation of non-conventional biomarkers analyzed during this period.

The first evidence that contracting skeletal muscles produces ROS was reported for almost 40 years by Dillard et al. (1978). In 1982, Davies and colleagues first suggested that ROS production in rats could modulate the skeletal muscle to exercise [Davies et al., 1982; Powers et al., 2016] being confirmed in humans only in 2007 [Bailey et al. 2007]. In parallel, it was found that both aerobic and anaerobic exercise can generate ROS from different sources: mitochondrial [Davies et al., 1982; Reid et al., 1992; Powers and Jackson, 2008; Becatti et al., 2017], xanthine oxidases [Sjödín et al., 1990; Becatti et al., 2017] and NADPH oxidases [Pyne, 1994; Becatti et al., 2017] being buffered by an array of endogenous (e.g. SOD, catalase, GPx) and exogenous (e.g. vitamin C, E, beta-carotene) antioxidant mechanisms [Reid, 2016; Becatti et al., 2017]. More recently, numerous studies support that while low levels of ROS are physiologically essential for control of gene expression and modulation of force production in skeletal muscle, high levels of ROS resulting in myocyte damage, compromising the muscle contractility, characterizing the well-known 'inverted U' curve [Dröge, 2002; Ascensão et al., 2008; Hadžović-Džuvo et al., 2014; Reid, 2016; Powers et al., 2016; Becatti et al., 2017]. Despite these important advances, the detailed physiological role of ROS in exercise in various sport modalities remains to be understood.

Studies relating ROS production with whole body in humans only became possible after 2010 [Reid, 2016; Powers et al., 2016; Becatti et al., 2017]. Therefore, in this context,

our study is innovative in sport medicine for some reasons. Firstly, this is the first study relating ROS with volleyball players, identifying a novel approach in this modality. Secondly, we reinforce the link between ROS and cell damage in elite athletes, clearly evidenced by increment of cell apoptosis/necrosis in the overreaching periods as suggested by others [Powers and Jackson, 2008; Hadžović-Džuvo et al., 2014; Russell et al., 2017]. It is worthwhile to point that the highest rates of apoptosis/necrosis that we observed were in more strenuous periods of physical activity with short intervals between games (unlike in the Olympic Games). These data were fundamental to establish the transition periods by staffs, 'running away' from traditional training protocols. Consequently, we reduced the accumulation period from 8-12 weeks to only 3 weeks, maintaining the same physical performance desired during 4-5 weeks, therefore avoiding unnecessary injuries. Thirdly, we demonstrate that it is possible to detect oxidative stress (even after 48h post-match or post-block) through the direct analysis of leukocyte ROS in blood instead of indirect measurements (by enzymatic pathways or oxidized molecules) corroborating the recent data obtained with elite soccer players which used only one type of probe (DCF) for ROS detection [Becatti et al., 2017]. Interestingly, as we routinely used three different probes to ROS detection (DCF, DHE and HPF) [Boa et al., 2015; Coutinho et al., 2017], we were able to define which one has greater sensitivity to measure oxidative stress: fluorescent probe for $\bullet\text{O}_2^-$ (named DHE). Then, to avoid unnecessary spending, we suggest that in future protocols for elite athletes, the DHE probe be the highest priority to investigate oxidative stress-induced homeostasis modulated by physical activity.

Regarding the conventional biomarkers, although currently some researchers have described that they may not represent reliable method to monitoring overreaching or overtraining in elite athletes [Ostojic and Ahmetovic, 2008; Reinke et al., 2009; Meyer and Meister, 2011], in volleyball this is still unknown. Thus, throughout these two seasons of 2015/2016, our data corroborates contemporary evidences observed in other sports modalities with elite athletes, showing only minor laboratory changes [Becatti et al., 2017]. Among all the conventional parameters evaluated, only serum CK was the parameter that showed values above the normal reference during the majority of seasons, especially with the athlete BS. Curiously, we detected that in most of the analyzed points, the high bioavailability of ROS shows similar profile comparable to its high levels of CK. This observation may be explained: as ROS can disrupt the membrane bilayer permeability by oxidation of membrane components, CK could increase its release to the blood [Brancaccio et al., 2007; Tokarska-

Schlattner et al., 2012; Ryu et al., 2016]. Regarding the difference observed among the athletes, this may be supported by interindividual variations and/or intensity of exercise [Brancaccio et al., 2007]. It is worth highlighting that in 2016, BS was elected as the best defensive and offensive player, justifying, at least, in part, his fundamental participation in the tournaments that could culminate with higher increment of CK.

As physical exercise training is an important modulator of gonadotrophic, somatotropic and corticotropic pathways, we also evaluated the profile of main involved hormones (testosterone, progesterone GH, IGF-1, insulin and cortisol). Although they are widely investigated in sports research, its applicability to the routine of the medical staff for athletes is still controversial [Hoogveen and Zonderland, 1996; Kanaley et al., 2001; Hadžović-Džuvo et al., 2014; Nassib et al. 2016]. Therefore, they could not be called classical 'conventional biomarkers', thus justifying the differentiated presentation (yellow box) in Figure 3 (E and F). As observed by others in different modalities, our results did not show any relation with established periodization's, evidencing that these hormones cannot be reliable biomarkers for elite BV athletes.

Lastly, but not least, it is known that some researchers assessed the T/C ratio to infer the anabolic/catabolic status of elite athletes even if there are considerable alterations of free testosterone during exercise, pulsating release and rapid clearance of this androgen [Hug et al., 2003]. Alternatively, recent findings have shown that IGF-1/C might be a useful substitute parameter of an imbalance between anabolic/metabolic metabolism compared to T/C, justified by linear production and longer half-life of IGF-1 [Hug et al., 2003; Nassib et al., 2016]. Observing the profile of these two ratios in our study, we support these previous observations, demonstrating that IGF-1/C showed better profile than T/C of BV athletes (Figure 3F). The IGF-1/C evidenced more clearly catabolism in pre-Olympic phase (justified by the intense dispute for the conquest of the Olympic berth).

Unfortunately, the main limitation of this investigation cannot be ruled out: the size of the study group is very limited, and these results need further confirmation in a larger population of athletes.

5. Conclusion

Overall, our findings suggest that leukocyte ROS production associated with apoptosis/necrosis index (classified as non-conventional markers) and IGF-1/cortisol ratio might be relevant evidences during the BV seasons to follow the performance of the players

in substitution to conventional serum biomarkers. These parameters may help prevent possible states of overtraining and injuries, opening a new avenue for optimizing the performance monitoring of elite BV athletes.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: HOA, FLA and TMCP. Performed the experiments: HOA and MLP. Analyzed the data: ECV, MPB and TMCP. Contributed reagents/materials/analysis tools: SSM, ECV, BPC and TMCP. Wrote the paper: HOA, ECV, BPC and TMCP. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the National Council for the Development of Science and Technology (CNPq, Ref. 445080/2014-0 and 445736/2014-3 Grants). We are grateful to the Tommasi Laboratory analysis for use of their facilities. This study would not have been possible without the participation of the professional beach volleyball players active during the 2015-2016 Olympic cycle. The authors are especially grateful for the support and help of the Brazilian Volleyball Confederation and training Technical Assistants: Adriano Fonseca, Altair Muniz da Silva, Bruno Lima Dupla Soares, Vinicius Almeida dos Santos, Rui Ribeiro (personal trainer), Claudinei Chamorro and Luis Bruce (physiotherapists), Samia Halage (psychologist) and Thierry Lemos (nutritionist).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

1. Ascensão A, Rebelo A, Oliveira E, Marques F, Pereira L, Magalhães J. Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clin Biochem.* 2008 Jul;41(10-11):841-51. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.04.008.
2. Bailey DM, Lawrenson L, McEneny J, Young IS, James PE, Jackson SK, Henry RR, Mathieu-Costello O, McCord JM, Richardson RS. Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. *Free Radic Res.* 2007 Feb;41(2):182-90.

3. Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. Metabolic markers in sports medicine. *Adv Clin Chem.* 2012;56:1-54. Review.
4. Becatti M, Mannucci A, Barygina V, Mascherini G, Emmi G, Silvestri E, Wright D, Taddei N, Galanti G, Fiorillo C. Redox status alterations during the competitive season in elite soccer players: focus on peripheral leukocyte-derived ROS. *Intern Emerg Med.* 2017 Mar 30. doi: 10.1007/s11739-017-1653-5.
5. Bôa IS, Porto ML, Pereira AC, Ramos JP, Scherer R, Oliveira JP, Nogueira BV, Meyrelles SS, Vasquez EC, Endringer DC, Pereira TM. Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. *PLoS One.* 2015 Dec 16;10(12):e0144329. doi: 10.1371/journal.pone.0144329. eCollection 2015. PubMed PMID: 26674346
6. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull.* 2007;81-82:209-30. Epub 2007 Jun 14. Review.
7. Coutinho PN, Pereira BP, Hertel Pereira AC, Porto ML, Monteiro de Assis ALE, Côgo Destefani A, Meyrelles SS, Vasquez EC, Nogueira BV, de Andrade TU, Endringer DC, Fronza M, Costa Pereira TM. Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr (-/-) mice. *J Ethnopharmacol.* 2017 May 11. pii: S0378-8741(17)31235-7.
8. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982 Aug 31;107(4):1198-205. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95. Review. PubMed PMID: 11773609.
9. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1978 Dec;45(6):927-32.
10. Hadžović-Džuvo A, Valjevac A, Lepara O, Pjanić S, Hadžimuratović A, Mekić A. Oxidative stress status in elite athletes engaged in different sport disciplines. *Bosn J Basic Med Sci.* 2014 May;14(2):56-62. PubMed PMID: 24856375
11. Homberg, S. and Papageorgiou, A. (1994) Handbook for beach volleyball. Meyer & Meyer Verlag.
12. Hoogeveen AR, Zonderland ML. Relationships between testosterone, cortisol and performance in professional cyclists. *Int J Sports Med.* 1996 Aug;17(6):423-8.

13. Hug M, Mullis PE, Vogt M, Ventura N, Hoppeler H. Training modalities: over-reaching and over-training in athletes, including a study of the role of hormones. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jun;17(2):191-209. Review. PubMed PMID: 12787547.
14. Hulka BS. Overview of biological markers. In: *Biological markers in epidemiology* (Hulka BS, Griffith JD, Wilcosky TC, eds), pp 3–15. New York: Oxford University Press, 1990.
15. Kanaley JA, Weltman JY, Pieper KS, Weltman A, Hartman ML. Cortisol and growth hormone responses to exercise at different times of day. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2881-9.
16. Kocabaş R, Namiduru ES, Bağçeci AM, Erenler AK, Karakoç Ö, Örkmez M, Akan M, Erdemli HK, Taysi S, Tarakçioğlu M. The acute effects of interval exercise on oxidative stress and antioxidant status in volleyball players. *J Sports Med Phys Fitness.* 2016 Sep 22.
17. Künstlinger U, Ludwig HG, Stegemann J. Metabolic changes during volleyball matches. *Int J Sports Med.* 1987 Oct;8(5):315-22. PubMed PMID: 3679645.
18. Lewis NA, Newell J, Burden R, Howatson G, Pedlar CR. Critical Difference and Biological Variation in Biomarkers of Oxidative Stress and Nutritional Status in Athletes. *PLoS One.* 2016 Mar 1;11(3):e0149927. doi: 10.1371/journal.pone.0149927. eCollection 2016.
19. Lippi G, Schena F, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Influence of acute physical exercise on emerging muscular biomarkers. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(9):1313-8. doi: 10.1515/CCLM.2008.250.
20. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx.* 2004 Apr;1(2):182-8. Review. PubMed PMID: 15717018
21. Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing Res Rev.* 2008 Jan;7(1):1-7. Epub 2007 Dec 5. Review.
22. Mazon J, Gastaldi A, Di Sacco T, Cozza I, Dutra S, Souza H. Effects of training periodization on cardiac autonomic modulation and endogenous stress markers in volleyball players. *Scand J Med Sci Sports.* 2013 Feb;23(1):114-20. doi: 10.1111/j.1600-0838.2011.01357.x.
23. McLeay Y, Stannard S, Houltham S, Starck C. Dietary thiols in exercise: oxidative stress defence, exercise performance, and adaptation. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017 Apr 27;14:12. doi: 10.1186/s12970-017-0168-9. eCollection 2017.
24. Medeiros A, Marcelino R, Mesquita I, Palao JM. Physical and temporal characteristics of under 19, under 21 and senior male beach volleyball players. *J Sports Sci Med.* 2014 Sep 1;13(3):658-65. eCollection 2014 Sep. PubMed PMID: 25177196
25. Meyer T, Meister S. Routine blood parameters in elite soccer players. *Int J Sports Med.* 2011 Nov;32(11):875-81. doi: 10.1055/s-0031-1280776. Epub 2011 Oct 21. PubMed PMID: 22020850.

26. Nassib S, Moalla W, Hammoudi-Nassib S, Chtara M, Hachana Y, Tabka Z, Chamari K, Elloumi M. The IGF-1/cortisol ratio as a useful marker for monitoring training in young boxers. *Biol Sport*. 2016 Mar; 33(1):15-22. doi: 10.5604/20831862.1180172. Epub 2015 Nov 19. PubMed PMID: 26985129; PubMed Central PMCID: PMC4786582.
27. Ostojic SM, Ahmetovic Z. Weekly training volume and hematological status in female top-level athletes of different sports. *J Sports Med Phys Fitness*. 2008 Sep;48(3):398-403. PubMed PMID: 18974729.
28. Papacosta E, Nassis GP, Gleeson M. Effects of acute postexercise chocolate milk consumption during intensive judo training on the recovery of salivary hormones, salivary SIgA, mood state, muscle soreness, and judo-related performance. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015 Nov;40(11):1116-22. doi:10.1139/apnm-2015-0243. Epub 2015 Jul 20.
29. Pyne DB. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med*. 1994 Apr;17(4):245-58.
30. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1243-76. doi: 10.1152/physrev.00031.2007. Review. PubMed PMID: 18923182
31. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol*. 2011 Apr;1(2):941-69. doi: 10.1002/cphy.c100054. Review.
32. Powers SK, Radak Z, Ji LL. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol*. 2016 Sep 15;594(18):5081-92. doi: 10.1113/JP270646. Epub 2016 Feb 19.
33. Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle. II.Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol (1985)*. 1992 Nov;73(5):1805-9.
34. Reid MB. Reactive Oxygen Species as Agents of Fatigue. *Med Sci Sports Exerc*. 2016 Nov;48(11):2239-2246.
35. Reinke S, Karhausen T, Doehner W, Taylor W, Hottenrott K, Duda GN, Reinke P, Volk HD, Anker SD. The influence of recovery and training phases on body composition, peripheral vascular function and immune system of professional soccer players. *PLoS One*. 2009;4(3):e4910. doi: 10.1371/journal.pone.0004910. Epub 2009 Mar 18. PubMed PMID: 19293937.

36. Ryu JH, Paik IY, Woo JH, Shin KO, Cho SY, Roh HT. Impact of different running distances on muscle and lymphocyte DNA damage in amateur marathon runners. *J Phys Ther Sci*. 2016 Jan;28(2):450-5. doi: 10.1589/jpts.28.450. Epub 2016 Feb 29. PubMed PMID: 27065529.
37. Russell M, Birch J, Love T, Cook CJ, Bracken RM, Taylor T, Swift E, Cockburn E, Finn C, Cunningham D, Wilson L, Kilduff LP. The Effects of a Single Whole-Body Cryotherapy Exposure on Physiological, Performance, and Perceptual Responses of Professional Academy Soccer Players After Repeated Sprint Exercise. *J Strength Cond Res*. 2017 Feb;31(2):415-421. doi: 10.1519/JSC.0000000000001505.
38. Sanchis-Gomar F, Lippi G. Physical activity - an important preanalytical variable. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014 Feb 15;24(1):68-79. doi: 10.11613/BM.2014.009. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 24627716; PubMed Central PMCID: PMC3936967.
39. Schwellnus M, Soligard T, Alonso JM, Bahr R, Clarsen B, Dijkstra HP, Gabbett TJ, Gleeson M, Hägglund M, Hutchinson MR, Janse Van Rensburg C, Meeusen R, Orchard JW, Pluim BM, Raftery M, Budgett R, Engebretsen L. How much is too much? (Part 2) International Olympic Committee consensus statement on load in sport and risk of illness. *Br J Sports Med*. 2016 Sep;50(17):1043-52. doi: 10.1136/bjsports-2016-096572.
40. Sjödin B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med*. 1990 Oct;10(4):236-54.
41. Soligard T, Steffen K, Palmer-Green D, Aubry M, Grant ME, Meeuwisse W, Mountjoy M, Budgett R, Engebretsen L. Sports injuries and illnesses in the Sochi 2014 Olympic Winter Games. *Br J Sports Med*. 2015 Apr;49(7):441-7. doi:10.1136/bjsports-2014-094538.
42. Smith DJ, Roberts D, Watson B. Physical, physiological and performance differences between Canadian national team and universiade volleyball players. *J Sports Sci*. 1992 Apr;10(2):131-8.
43. Thorpe RT, Atkinson G, Drust B, Gregson W. Monitoring Fatigue Status in Elite Team-Sport Athletes: Implications for Practice. *Int J Sports Physiol Perform*. 2017 Apr;12(Suppl 2):S227-S234. doi: 10.1123/ijsp.2016-0434.
44. Tokarska-Schlattner M, Epand RF, Meiler F, Zandomenighi G, Neumann D, Widmer HR, Meier BH, Epand RM, Saks V, Wallimann T, Schlattner U. Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects. *PLoS One*. 2012;7(8):e43178. doi: 10.1371/journal.pone.0043178. Epub 2012 Aug 17.

45. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.* 2005;35(12):1045-62.
46. Winsley R, Matos N. Overtraining and elite young athletes. *Med Sport Sci.* 2011;56:97-105. doi: 10.1159/000320636.
47. Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian J Sports Med.* 2015 Mar;6(1):e24898. doi: 10.5812/asjrm.24898. Epub 2015 Feb 20. Review. PubMed PMID: 25883776