

RESPOSTA LEUCOCITÁRIA DE JOGADORES DE FUTEBOL. ANÁLISE DA FASE PREPARATÓRIA À FASE DE COMPETIÇÃO.

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

DIOGO CRISTIANO NETTO

**RESPOSTA LEUCOCITÁRIA DE JOGADORES DE
FUTEBOL. ANÁLISE DA FASE PREPARATÓRIA À
FASE DE COMPETIÇÃO.**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Educação Física

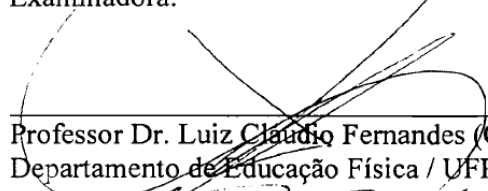


TERMO DE APROVAÇÃO

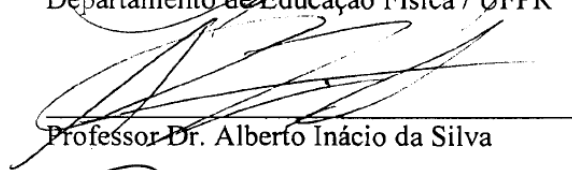
DIOGO CRISTIANO NETTO

“Resposta Leucocitária de Jogadores de Futebol. Análise da Fase Preparatória à Fase de Competição”


Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física – Área de Concentração Exercício e Esporte, Linha de Pesquisa Fisiologia da Performance, do Departamento de Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:



Professor Dr. Luiz Claudio Fernandes (Orientador)
Departamento de Educação Física / UFPR



Professor Dr. Alberto Inácio da Silva



Professor Dr. Raul Osiecki

Curitiba, 30 de Junho de 2009

www.edf.ufpr.br

Campus Jardim Botânico-CEP: 80.215-370 – Curitiba/PR
Telefone: (41) 3362-8745 Fax (41) 3360-4336
email: mestrado_edf@ufpr.br danieldias@ufpr.br

***“Mas o nobre,
projeta coisas nobres,
e na sua nobreza perseverará”
(Isaías 32:8)***

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me abençoado e me dado forças em todos os momentos da minha vida.

A minha esposa Alane Bresolin Netto, pela paciência, atitudes e palavras de incentivo nos momentos difíceis. À minha mãe, aos meus tios, em especial, o tio Osni o tio Rivaldir por me ajudar financeiramente quando eu mais precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pelo exemplo de docente e pesquisador, pela oportunidade, confiança, incentivo, pelos conselhos sempre oportunos, pelo apoio e muita paciência, que possibilitaram o desenvolvimento desta dissertação.

Ao departamento de Fisiologia, pelo espaço cedido ao meu trabalho, que com seus altos e baixos é tudo o que sonhei durante a minha graduação.

A todos os companheiros de laboratório, em especial o Everson Araújo Nunes, que me auxiliou em todos os momentos do mestrado, obrigado pelo tempo e paciência investidos em mim. Ao Ricardo Key Yamazaki, Sandro J. R. Bonatto, Gleisson A. P. Brito, Daniele Vitorino, Danielle Pequito, Jaisson e ao Juliano, que contribuíram para a realização deste trabalho, desde aqueles que me ajudaram com uma simples conversa a aqueles que estiveram presentes comigo nos dias de experimento. Muito obrigado a todos vocês.

Gostaria de agradecer ao professor Raul Osiecki, pelo exemplo de pessoa e professor que é (Professor Raul, você é um exemplo de fisiologista do futebol pra mim!).

Ao Paraná Clube, especialmente ao Rodrigo Rezzende (Preparador Físico) e ao André Fornazieiro (Fisiologista) que me auxiliaram com informações durante o desenvolvimento da pesquisa. Aos jogadores que literalmente deram o “sangue” em nome da Ciência.

Ao Clube Atlético Paranaense, em especial aos professores André Leite e ao Raphael Biazetto e ao CAPA, em especial ao Luis Carlos Silvério que me liberaram do trabalho para os compromissos com o mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1.0 INTRODUÇÃO	01
1.1 Apresentação do problema	01
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Sistema Imunológico	03
2.2 Sistema Imunológico e Exercício	05
2.3 Periodização do Treinamento	10
3.0 OBJETIVOS	16
3.1 Geral	16
3.2 Específicos	16
4.0 METODOLOGIA	17
4.1 Sujeitos	17
4.2 Instrumentos e Procedimentos	17
4.3 Caracterização das atividades nos diferentes períodos de treinamento	17
4.4 Coleta e separação de células sanguíneas	18
4.5 Isolamento dos neutrófilos sanguíneos	20
4.6 Determinação dos parâmetros plasmáticos e imunitário	20
4.6.1 Reagentes e enzimas	19
4.6.2 Linfócitos	20
4.6.3 Avaliação da capacidade proliferativa de células mononucleares sanguíneas	20
4.7 Metodologia dos ensaios para polimorfonucleares (neutrófilos)	20
4.7.1 Soluções	20
4.7.2 Capacidade fagocítica	21
4.7.3 Produção de Peróxido de Hidrogênio	21
4.7.4 Mensuração do ânion superóxido	22
4.7.5 Conteúdo de vesículas catiônicas	22
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5.0 RESULTADOS	24

5.1	Capacidade fagocítica relativa.....	24
5.2	Capacidade de Produção Relativa de Ânion Superóxido	25
5.3	Volume lisossomal	26
5.4	Produção relativa de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	27
5.5	Proliferação Linfocitária	28
6.0	DISCUSSÃO	29
7.0	CONCLUSÃO	35
8.0	ORÇAMENTO	36
9.0	CRONOGRAMA	37
10.0	REFERÊNCIAS	38
11.0	APÊNDICE	44
11.1	Documento, para a permissão da execução das avaliações nos atletas do Paraná Clube	44
11.2	Termo de consentimento	45
11.3	Carta da aprovação do Comitê de Ética	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS IMUNITÁRIOS PRÉ-ESTABELECIDOS EM ATLETAS EM REPOUSO E APÓS TREINAMENTO INTENSO	09
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – VISÃO TRADICIONAL E REVISADA DAS DIVISÕES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO 03

FIGURA 2 – PROPOSTA DO COMPORTAMENTO DA CURVA EM “S” RELACIONADA ENTRE CARGA DE TREINAMENTO E POSSIBILIDADE DE INFECÇÕES..... 07

FIGURA 3 - ESQUEMA GENERALIZADO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO MODERADO E INTENSO NA FUNÇÃO IMUNITÁRIA E SUSCETIBILIDADE À INFECÇÕES 08

FIGURA 4 – RESULTADOS DA FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS DE ZIMOZAN POR CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES SANGUÍNEAS 24

FIGURA 5 – RESULTADOS DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO RELATIVA DE ÂNION SUPERÓXIDO 25

FIGURA 6 – RESULTADOS DA PRODUÇÃO RELATIVA DE LISSOSSOMOS..... 26

FIGURA 7 – RESULTADOS DA PRODUÇÃO RELATIVA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CBF	- CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE FUTEBOL
CD4 ⁺	- LINFÓCITO T AUXILIAR
CD8 ⁺	- LINFÓCITO T CITOTÓXICO
CON A	- CONCAVALINA A
CPM	- CONTAGEM POR MINUTO
EPM	- ERRO PADRÃO DA MÉDIA
FC	- FINAL DA COMPETIÇÃO
FPP	- FINAL DO PERÍODO PREPARATÓRIO
H ₂ O ₂	- PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
IC	- INÍCIO DA COMPETIÇÃO
IgA	- IMUNOGLOBULINA A
IgD	- IMUNOGLOBULINA D
IgE	- IMUNOGLOBULINA E
IgG	- IMUNOGLOBULINA G
IgM	- IMUNOGLOBULINA M
IL	- INTERLEUCINAS
IPP	- INÍCIO DO PERÍODO DE PREPARAÇÃO
ITRS	- INFECÇÃO DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR
NK	- CÉLULAS NATURAL KILLER
O ₂ ⁻	- ÂNION SUPERÓXIDO
OPEN WINDOW	- JANELA IMUNOLÓGICA
PBS	- TAMPÃO FOSTATO-SALINA

RESUMO

O futebol moderno exige jogadores rápidos, fortes, capazes de vencer resistências e suportar cargas intensas e, ao mesmo tempo, durante o jogo, manter o nível de rendimento alto na presença de fadiga. No presente estudo foi analisado a resposta leucocitária de jogadores de futebol, da fase preparatória à fase de competição. Participaram do estudo 10 jogadores do sexo masculino, idade cronológica entre 17 à 20 anos, da categoria Juniores do Paraná clube filiado à CBF (Confederação Brasileira de Futebol) e participante da Copa Tribuna organizada pela FPF (Federação Paranaense de Futebol). Foram feitas três coletas de sangue, onde a primeira foi antes do período de preparação, a segunda foi no final desse período e início do período de competição, e a terceira foi no final desse último período. Os parâmetros analisados foram: capacidade fagocítica, Capacidade de Produção de Ânion Superóxido, Produção de Lisossomos, Produção de Peróxido de Hidrogênio, Proliferação Linfocitária. O protocolo de pesquisa foi delineado conforme as diretrizes propostas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisas envolvendo seres humanos, e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para analisar os escores nos mesmos indivíduos em ocasiões sucessivas (Período de Preparação, intervalo entre o Final do Período de Preparação e Início da Competição e Final da Competição) foi utilizado o teste “t” de Student pareado. Para as respostas leucocitárias dos jogadores de futebol foi utilizado ANOVA seguido de pós teste de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os procedimentos estatísticos do presente estudo foram realizados mediante a utilização do *Graph Pad Prism 5.0*. Foram encontrados diferenças significativas entre os três momentos da periodização nos parâmetros de fagocitose. Não foram encontradas alterações da resposta leucocitária dos jogadores referente à capacidade relativa de fagocitose, na produção relativa de H_2O_2 , na produção relativa de lisossomos e nem na produção relativa de O_2^- , quando comparados ao início do Período de Preparação. Houve diferença significativa no percentual de variância no índice de proliferação linfocitária ($P < 0,05$) referente ao final de competição comparado ao início do Período de Preparação. Os resultados do presente estudo, diferem de outros encontrados na literatura devido ao delineamento experimental, o que dificulta a comparação entre seus resultados e os encontrados na presente pesquisa. Vale ressaltar que o período experimental (acompanhamento à longo prazo) pode ser um importante contribuinte para as diferenças entre os estudos, uma vez que a maioria deles foram feitos através de respostas agudas ao exercício, onde os sujeitos eram jogadores profissionais e submetidos a diferentes cargas de treinos e jogos.

Palavras chaves: Futebol, sistema imunitário, fagocitose e espécies reativas.

ABSTRACT

The modern football requires players fast, strong, able to overcome resistance and carry loads and intense at the same time during the game, maintaining the high level of performance in the presence of fatigue. In the present study examined the leukocyte response of football players, the preparatory phase of the competition. 10 players participated in the study were male, age between 17 to 20 years, the category of Junior of Paraná Clube, affiliated to the CBF (Brazilian Football Confederation) and participant of the Tribune Cup organized by FPF (Paranaense Football Federation). Were three samples of blood, where the first was before the period of preparation, the second was at the end of that period and beginning of the competition, and the third was at the end of that last sentence. The parameters analyzed were: phagocytic ability, production capacity of Superoxide Anion, lysosomes Production, Production of Hydrogen Peroxide, lymphocyte proliferation. The research protocol was designed according to the guidelines proposed in the Resolution 196/96 of the National Health Council on research involving humans, and has been submitted and approved by the Ethics Committee of the Division of Biological Sciences, Federal University of Parana (UFPR). To analyze the scores in the same individuals on successive occasions (Preparation Period, Final of Period of Preparation and beginning of Competition and final of Competition) test was used "t" Student's paired. For the leukocyte responses of footballers was used after ANOVA followed by Tukey test. The level of significance was $p < 0,05$. The statistical procedures of this study were performed using the Graph Pad Prism 5.0. We found significant differences between the three time periods of the parameters and phagocytosis. There were no changes in leukocyte response of the players on the relative capacity of phagocytosis, production of H_2O_2 on, production on the lysosomes and not on the production of O_2^- when compared to the beginning of pre-season. Significant difference in the percentage of variance in the rate of lymphocyte proliferation ($P < 0.05$) on the end of competition compared to the beginning of pre-season. The results of this study, differ from others in the literature due to experimental design, which complicates the comparison between their results and those found in this study. It is noteworthy that the experimental period (monitoring the long term) may be an important contributor to the differences between studies, since most of them were made through responses to acute exercise, where the subjects were professional players and subjected to different loads of drills and games.

Keywords: Football, immune system, phagocytosis and reactive species.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

O futebol é o esporte mais praticado no mundo, e pode ser caracterizado pela realização de esforços de alta intensidade e curta duração, interposto por períodos de menor intensidade e duração variada.

O exercício pode ter efeitos positivos e negativos sobre a função imunitária e suscetibilidade à doenças (GLEESON, 2007).

O futebol consiste em saltos e corridas intermitentes de altas intensidades e com movimentos rápidos de aceleração e desaceleração (SPIRIDIS, 2008). Ainda, trata-se de um jogo com bastante trabalho anaeróbio seguido de exercícios contínuos de corrida (NICHOLAS *et al.*, 2000).

Uma partida de futebol inclui períodos de atividades de alta intensidade, e o sucesso na *performance* depende de muitos fatores, incluindo técnica, tática, física, fisiológica e habilidades mental (MEEUSEN, 2006).

O futebol moderno exige jogadores rápidos, fortes, capazes de vencer resistências e suportar cargas intensas e, ao mesmo tempo, durante o jogo, manter um alto nível de rendimento na presença de fadiga, demonstrando ser um jogo com grande demanda energética e com muita variação durante as partidas (BANGSBO, 1994). Portanto, o jogador deve ter força, velocidade, resistência e flexibilidade de forma harmônica e conjugada (MUJIKKA *et al.*, 2000).

A atividade física se praticada com intensidade leve até moderada tem ação estimulatória, se com alta e intensa tem efeito imunossupressor, levando a diminuição da proliferação dos linfócitos, atividade dos neutrófilos, razão CD4+/CD8+ e a produção de anticorpos (NIEMAN, 2001b) e (MACKINNON, 2000).

Muitas alterações nas funções do sistema imunológico têm sido notadas a nível celular depois de exercícios extremos e exaustivos. Isso inclui na supressão das funções dos neutrófilos e supressão da proliferação linfocitária (MACKINNON, 2000).

Como o futebol é um esporte com temporadas de competições, é importante que os jogadores iniciem a temporada com um condicionamento satisfatório (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION REPORTS, 1993). Com isso, a busca pelo

conhecimento científico dessa modalidade tem aumentado a cada dia, para que o desempenho dos atletas seja otimizado. Este pensamento deve estar o mais distanciado possível de toda improvisação, integrar os conhecimentos em um sistema estrutural e organizado, mais perto da ciência e tecnologia, pois se houver aplicação de cargas excessivas durante o treinamento, será um estressor negativo para o organismo, podendo causar estresse desconfortável, perigoso e prejudicial à *performance* e à saúde do atleta (GROSS, 1994).

O treinamento do futebol pode ser colocado em um contexto ergonômico (REILLY, 2005). Nessa perspectiva, encontramos a Periodização, importante componente do Treinamento Desportivo para a organização e sistematização dos treinamentos. É o planejamento geral e detalhado do tempo disponível para o treinamento, de acordo com os objetivos intermediários perfeitamente estabelecidos, respeitando-se os princípios científicos do exercício desportivo (DANTAS, 1995).

A Periodização é dividida, tradicionalmente, em três períodos: Preparação, Competição e Transição ou Recuperação (SMITH, 2003a).

O Período de Preparação é a época em que o atleta será elevado à condição competitiva na temporada considerada. Este período é variável de acordo com o tipo de periodização escolhida e os calendários disponíveis para a execução da mesma (DANTAS, 1995).

O Período de Competição é o produto de toda a preparação realizada anteriormente, onde os atletas aplicarão todos os esforços para a melhor *performance* possível. Esse período é também chamado de *Período de Manutenção*, onde envolve todo o tempo em que se desenvolvem as competições e na maioria das vezes abrange pequeno período que antecede as disputas principais. Ainda, o treinamento não é interrompido, pois esse procedimento acarretaria sérios prejuízos nas atuações dos atletas (TUBINO, 1979).

Após a temporada, os jogadores entram em período de férias, chamado de período de transição entre o fim de uma temporada e início da outra. Esse período proporciona ao atleta uma recuperação física e psicológica após o grande esforço realizado durante as competições e terá duração de aproximadamente um mês num macrociclo anual. Caracteriza-se por utilizar níveis de intensidade bastante baixos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). O período de transição tem objetivo de recuperar o atleta e evitar lesões (DANTAS, 2003).

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sistema imunológico

O sistema imunológico protege, reconhece, ataca e destrói elementos existentes externos ao corpo e a maior função do sistema imunológico é proteger o corpo contra doenças infecciosas (GLEESON, 2006). O sistema imunológico é dividido em dois grandes ramos: o sistema inato e o adaptativo. Uma nova divisão entre esses dois sistemas foi apontado (SMITH, 2003b).

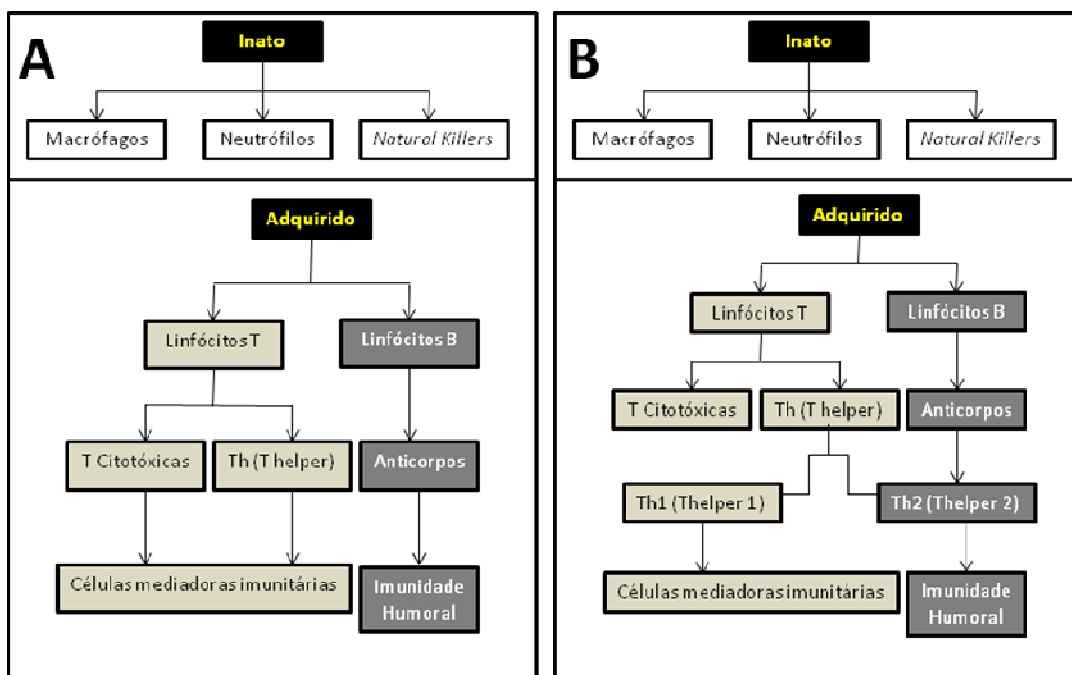


Figura 1 - (A) Visão tradicional das divisões do Sistema Imunológico. (B) Visão revisada das divisões do Sistema Imunológico. Segundo SMITH (2003b).

O sistema inato caracteriza-se por responder aos estímulos de maneira não específica. O sistema adaptativo caracteriza-se por responder ao antígeno de modo específico, apresentando memória. O primeiro é composto pelos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e células *natural killer*, e por fatores solúveis: sistema complemento, proteínas de fase aguda e enzimas. O segundo é composto por células: linfócitos T e B e por fatores humorais, as imunoglobulinas. Essa divisão

é didática e elementos do sistema inato podem agir como efetores do sistema adaptativo (COSTA ROSA e VAISBERG, 2002). A interação entre essas duas categorias resulta no que chamamos de imunidade (BORGHANS; NOEST; BOER, 1999).

Embora as respostas imunológicas inata e adaptativa sejam fundamentalmente distintas em seus mecanismos de ação, a sinergia entre essas é essencial para uma resposta imunológica inteiramente efetiva e intacta (CHAPLIN, 2006).

Os linfócitos são classificados em linfócitos T (células derivadas do timo, que agem contra patógenos intracelulares, constituindo a imunidade mediada por células), linfócitos B (células derivadas da medula óssea, constituindo a imunidade humoral) e células NK (“natural killer”). Linfócitos T são divididos de acordo com suas funções em linfócitos T “helper”, as quais são distinguidas pela presença da molécula CD4 em sua superfície, e linfócitos T citotóxicos, que apresentam em sua superfície moléculas CD8. Linfócitos T citotóxicos são capazes de matar células infectadas, e linfócitos T “helper” auxiliam as células B a combater infecções por produzirem citocinas específicas. As células do sistema imunitário são encontradas na circulação sanguínea, organizadas dentro de órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos, ou dispersas em outros locais no corpo (CALDER, 2001; BERRIDGE, 1997).

A comunicação entre o sistema imunológico adaptativo e o inato ocorre por contato direto célula-célula e pela produção de mensageiros químicos. Estes mensageiros químicos são proteínas chamadas interleucinas (IL) que agem regulando a atividade das células que produzem citocinas à de outras células. Cada IL pode ter múltiplas atividades sobre diferentes células. As IL estão envolvidas no controle da imunidade, na resposta à fase aguda, nas reações inflamatórias e no reparo de danos teciduais (ISPIRLIDIS, 2008). As citocinas agem por se ligarem a receptores específicos na superfície celular e induzir mudanças no crescimento, desenvolvimento ou atividade das células alvos. Citocinas pró-inflamatórias são predominantemente produtos do sistema imunitário. Entretanto, células endoteliais e fibroblastos também têm capacidade para produzi-las.

Biologicamente, a citocina denominada TNF (“tumor necrosis factor”) age como desencadeadora que ativa uma cascata de produção de citocinas. A molécula

de TNF é liberada rapidamente em resposta a agentes inflamatórios e infecciosos, e induz à produção de um grande número de outras citocinas (CALDER, 2001; GRIMBLE, 1998). TNF- α , IL-1 e IL-6 são as citocinas mais importantes produzidas por monócitos e macrófagos. Estas citocinas estimulam neutrófilos, monócitos e macrófagos a iniciarem a destruição de células bacterianas e tumorais, estimulam a proliferação de linfócitos T e B e estimulam a produção de outras citocinas. A produção de quantidades apropriadas de TNF, IL-1 e IL-6 é claramente benéfica em resposta à infecção, mas a produção inapropriada pode ser perigosa e estas citocinas, especialmente TNF, são causas de respostas patológicas que ocorrem em condições inflamatórias (CALDER, 2001).

Linfócitos T “helper” são funcionalmente subdivididos de acordo com as citocinas que produzem. Linfócitos T “helper” tipo 1 (Th1) produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ) que ativam macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos. Linfócitos T “helper” tipo 2 (Th2) produzem IL-4, que estimula a produção de imunoglobulina e pelos linfócitos B, IL-5, um fator ativador de eosinófilos, e IL-10, que juntamente com a IL-4 suprime a imunidade mediada por células. A desregulação entre as respostas de Th1 e Th2 é uma característica de muitas doenças humanas.

2.2 Sistema imunológico e exercício

Há pouco mais de 100 anos, em 1893, foi publicado o primeiro artigo relatando alterações encontradas em células do sangue após a prática de exercício físico. Até o início da década de 70 foi pouco expressiva a produção científica relacionando exercício e sistema imunológico, porém, a partir dessa época, houve aumento exponencial dos trabalhos nesse campo (NIEMAN & NEHLSSEN, 1994).

Novas tecnologias tem possibilitado estudos em relação a mudanças na *performance* no jogo. Ainda, é possível detectar as diferenças individuais nas demandas físicas em jogos e treinamentos. Essas diferenças não são somente relacionadas ao estado de treinamento de jogadores e suas posições no jogo, mas também na sua função tática específica (BANGSBO, 2006).

O exercício físico é capaz de aumentar ou diminuir a resposta imune dependendo da intensidade e duração do exercício (SUREDA *et al.*, 2009). Atletas profissionais são geralmente expostos a períodos intensos de elevados stress físicos com poucos momentos de descanso e recuperação (REINKE *et al.*, 2009).

A causa do aumento de índice de infecções em atletas é multifatorial, onde uma variedade de estressores, físicos, psicológicos, ambientais e nutricionais, podem levar a uma imunodepressão. Esses fatores podem favorecer atletas a um estado mais suscetíveis a infecções, mas o grau de exposição a patógenos é outro importante fator na real determinação de incidência a infecções.

O exercício físico gera um desvio do estado de homeostase orgânica, levando à reorganização da resposta de diversos sistemas, entre eles o imunológico. O exercício é genericamente classificado como estímulo estressante, onde se deve dividir a resposta ao exercício em dois componentes: resposta aguda e adaptação crônica (NIEMAN & NEHLSSEN, 1994). A resposta aguda é a reação transitória ao estresse; o estímulo crônico gera a resposta de adaptação crônica ao exercício, que habilita o organismo a tolerar de maneira mais adequada o estresse.

Estudos sugerem que o treinamento intenso suprime a função imunitária, aumentando a suscetibilidade à infecções (NIEMAN, 1999). Além disso, o exercício intenso durante a doença pode diminuir a capacidade do organismo em reagir contra infecções e aumentar ainda mais o risco de complicações (PEDERSEN, 2000). Nem todos os atletas, entretanto, apresentam redução da função imunitária durante o treinamento.

Quando há sobrecarga no treinamento, diminuindo conseqüentemente o rendimento do atleta, ocorre o denominado *overreaching*, caracterizado pelo desequilíbrio entre a carga de treino e a resistência do atleta (HUG *et al.*, 2003). Se este se prolonga por mais tempo, estabelece-se o *overtraining* (JAKERMAN, 1994). Alguns autores usam a expressão “Inexplicável síndrome da diminuição da performance, ao invés de *overtraining*, que se caracteriza pela diminuição da performance quando a carga de treino é aumentada, levando ao estado de exaustão e fadiga persistentes (HUG *et al.*, 2003).

As intensidades de esforços do futebol variam de acordo com o planejamento e do calendário das competições. Sessão de exercício físico leve a moderado proporciona reforço da função imunitária e de defesa do organismo que dura por

várias horas durante a recuperação. O exercício físico moderado melhora as funções do sistema imunitário, mas um período de exercício físico exaustivo exerce efeito oposto e enfraquece profundamente a primeira linha de defesa do corpo contra agentes infecciosos (NIEMAN, 2001a).

A distância percorrida por jogadores de alto nível é de 10 à 13 km (BANGSBO et. al., 2006). Entretanto, parte dessa distância é realizada por caminhadas e corridas de baixa intensidade, que requerem menor gasto energético. Obviamente exercícios realizados nessas distâncias diferem os jogadores profissionais dos de menor padrão.

Indivíduos que se exercitam moderadamente exibem baixa incidência de doenças do trato respiratório superior quando comparados com as de população sedentária (GLEESON, 2006).

Exercício de baixa intensidade a moderado aumenta a imunovigilância diminuindo o risco de infecções, já o exercício muito intenso diminui a imunovigilância aumentando o risco de infecções (NIEMAN, 2000).

Em contraste, incluindo-se atletas de elite em treinamento intenso, MALM (2006) propôs uma linha em “S”, diferenciando da supra-citada que tinha comportamento em “J”, como podemos visualizar na figura 2. A proposta da curva em “S” se deve à relação entre a carga de exercício e o risco de infecções, considerando aspectos à atletas de elite, onde os dados foram baseados em estudos publicados anteriormente.

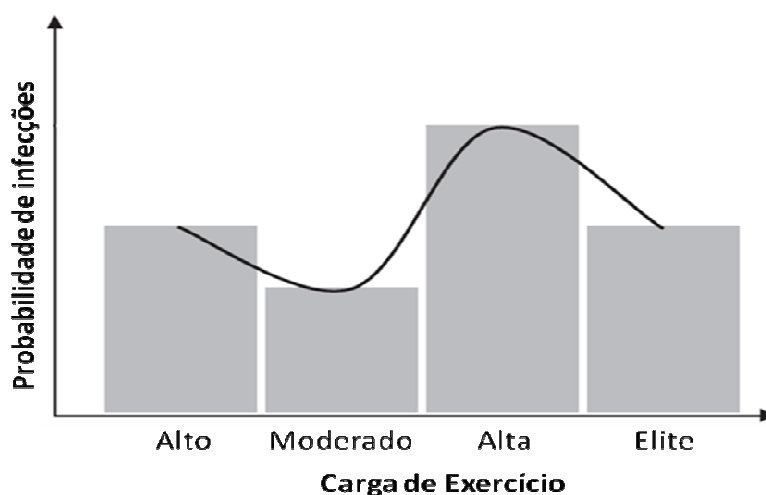


Figura 2 - Proposta do comportamento da curva em “S” relacionada entre carga de treinamento e probabilidade de infecções (MALM, 2006).

O mecanismo responsável pela alta incidência de sintomas relacionados a doenças do trato respiratório superior entre atletas ainda não é bem conhecido, mas tem sido proposto: altas taxas de fluxo ventilatório alterando a superfície da mucosa; infiltração de células inflamatórias no interior da mucosa; supressão de uma ou mais funções do sistema imunitário; depleção de fatores necessários ao sistema imunitário e estresse psicológico (MACKINNON, 1997).

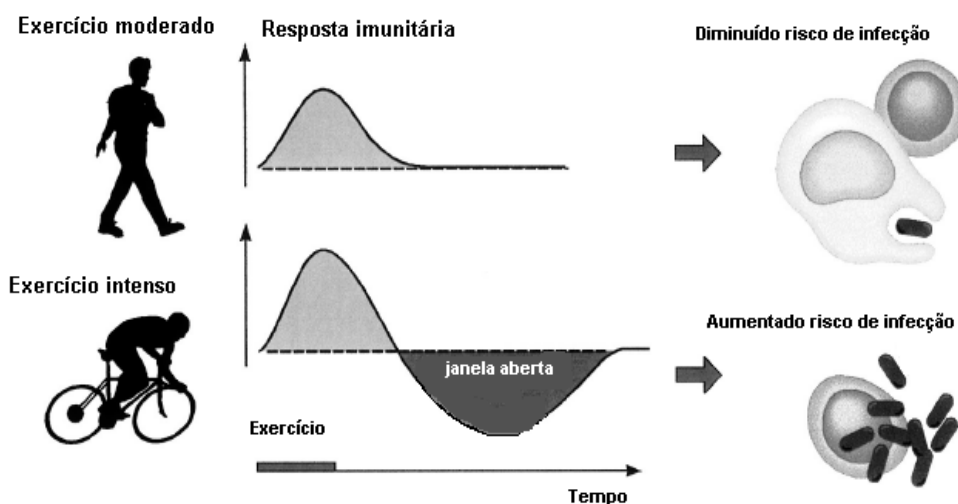


Figura 3 - Esquema generalizado dos efeitos do exercício moderado e intenso na função imunitária e suscetibilidade à infecções. Modificado de FEBBRAIO & PEDERSEN (2002).

Muitos componentes do sistema imunitário apresentam mudanças após o exercício intenso (NIEMAN, 2001b). Durante este “espaço de tempo” (open window), que acontece de 3 à 72 horas, ocorre alteração das funções imunitárias, dependendo do tipo, duração e intensidade do exercício. Neste período bactérias e vírus poderiam ganhar força, aumentando riscos de infecções (NIEMAN & PEDERSEN, 1999).

De acordo com o conceito “espaço de tempo” o exercício moderado estimula a função imunitária durante e por um curto tempo após o exercício. Em contraste, exercício intenso causa estimulação inicial seguida de longa supressão. Nos indivíduos que realizam, regularmente, apenas exercício moderado, este “espaço de tempo” para a infecção permanece fechado e observa-se a manutenção dos benefícios protetores do exercício regular conforme a figura 2.

NIEMAN (2001a) discutiu o “espaço de tempo” relacionando-o com o sistema imunitário seguido de treinamento intenso, observando a atividade das células NK e o risco de infecções. Na maioria dos casos, a resposta foi relativamente transitória, durando somente poucas horas. Mas outros estudos demonstraram que chega a afetar de 24 até 48 horas após exercício intenso prolongado.

Existem evidências associadas ao exercício prolongado e intenso com efeitos adversos no sistema imunitário. Esses efeitos incluem: diminuição da atividade citotóxica das células NK; baixa circulação dos números de linfócitos T após 3 ou 4 horas de exercício; diminuição da habilidade de proliferação dos linfócitos; diminuição da atividade dos neutrófilos; diminuição das concentrações de imunoglobulinas na saliva e sangue; enfraquecimento da síntese de anticorpos e; diminuição da razão de células CD4/CD8 (Tabela 1).

TABELA 1 - PARÂMETROS IMUNITÁRIOS PRÉ-ESTABELECIDOS EM ATLETAS EM REPOUSO E APÓS TREINAMENTO INTENSO.

PARÂMETRO IMUNITÁRIO	VALORES EM ATLETAS EM REPOUSO	APÓS TREINAMENTO INTENSO
Número de leucócito	Normal	Sem mudanças
Número de linfócitos	Normal	Sem mudanças ou aumento
Razão CD4+/CD8+	Normal ou alta	Diminuição
Proliferação e ativação dos linfócitos	Normal ou alta	Aumenta
Atividade citotóxica das células NK	Normal ou alta	Diminui
Concentração de IgA na mucosa	Baixa à normal	Diminui com o aumento da intensidade
Concentração de glutamina plasmática	Normal	Diminui ou aumenta
Anticorpos séricos específicos	Normal	Sem mudanças

Adaptado de Mackinnon, 2000.

É possível que a leucopenia seja refletida após um período de treinamento intenso. Número de células NK pode diminuir durante um período curto (1-4 semanas) ou longo (7 meses) de treinamento intenso. Por exemplo, os números de células declinaram mais de 40% durante 10 dias de treinamento intenso de corrida, em militares treinados (MACKINNON, 2000). Em outro estudo, número e porcentagem de células NK diminuíram em 30-40% após 7 meses de treinamento intenso de natação. Tanto as células NK quanto sua atividade citotóxica diminuiu em nadadores sob treinamento intenso, após 4 semanas. Exercício prolongado intenso causa supressão transitória da atividade de citotoxicidade da célula NK, durando pelo menos 6 horas ou até mais de 12 horas (MACKINNON, 2000). Para reverter o quadro clínico (Tabela 1) gerado por treinamento intenso, alguns autores têm sugerido que 2 a 5 semanas de descanso de treinamento pode restaurar a função imunitária (SHARP,1992).

2.3 Periodização do treinamento

O treinamento desportivo tem evoluído consideravelmente nas últimas décadas. Essa evolução, dentre outros fatores, ocorreu graças aos técnicos desportivos e à busca de novos caminhos que responderam às questões relacionadas com a adaptação do organismo às cargas de treinamento, utilizando um plano estratégico que permita maximizar o rendimento do desportista em momentos-chave, especialmente nas competições mais importantes.

A planificação deve abranger desde os exames iniciais e os correspondentes às diferentes fases de preparação do atleta, sua participação na competição, a análise periódica dos resultados por ele obtido até o reinício das suas atividades, visando uma nova temporada atlética (SILVA *et. al.*,2002). Assim entendemos ser o procedimento de organização e filosofia altamente profissional nesse tipo de atendimento, sem improvisações de última hora e sem desperdício de trabalho. Essa estrutura deve ser oferecida aos atletas, pois somente com respaldo científico poderão responder eficientemente às necessidades do futebol de alta competição da atualidade.

Nessa perspectiva, a Periodização é um dos mais importantes conceitos do planejamento do treinamento. Seu idealizador foi o russo Yakolev Matveev, bioquímico desportivo que idealizou a periodização do treinamento apoiado em avaliações estatísticas do comportamento em atletas de diversas modalidades esportivas da ex. União Soviética nas décadas dos anos 50 e 60. O termo Periodização origina-se da palavra “*período*”, que é uma porção ou divisão do tempo em pequenos segmentos, mais fáceis de controlar denominadas fases (BOMPA, 2001). O mesmo autor relata ainda que o programa anual é uma ferramenta que norteia o treinamento atlético que se divide em fases e princípios. A periodização do treinamento desportivo pode ser entendida como uma divisão organizada do treinamento anual ou semestral dos atletas na busca de prepará-los para alcançar certos objetivos estabelecidos previamente, obter um grande resultado competitivo em determinado ponto culminante na temporada esportiva, ou seja, obter a forma esportiva através da dinâmica das cargas de treinamento ajustadas ao seu ponto máximo (MC FARLANE, 1986).

Ao se evidenciar a questão do esporte de alto rendimento, muitos pesquisadores em seus experimentos, procuram investigar e explicar os processos de treinamento no tocante aos aspectos biológicos relacionando-os com a forma desportiva (ALMEIDA, 2000). Verifica-se, no entanto, que esta, mesmo quando analisada dentro de um contexto multifatorial, que considera a existência de uma série de variáveis intrínsecas e extrínsecas, interferindo direta ou indiretamente no rendimento desportivo; não considera que a probabilidade de obtenção da forma desportiva pode ser determinada não somente pelo controle destes muitos fatores e suas subdivisões, mas também pela forma com que os mesmos são inter-relacionados e harmoniosamente organizados em função do sujeito, durante todo o período de treinamento (GLEESON, 2002).

Com o objetivo de melhorar a habilidade e desempenho nas competições, atletas se preparam cada vez mais nos processos de treinamentos com objetivos de otimizar as funções fisiológicas corporais, assim como da performance. Para que esse processo tenha êxito, as cargas de treinamento devem equilibrar-se e obedecer três componentes principais: intensidade, duração e frequência (SMITH, 2003a). Os principais determinantes das cargas de treinamento incluem: a especificidade do treinamento (treinamento geral *versus* específico), carga dos

estímulos do treinamento, a magnitude do treinamento, desenvolvimento do estado da performance relativa; a duração e a intensidade dos ciclos de treinamento durante o ano e a seqüência e inter-relação entre os elementos do treinamento entre determinadas competições (SIFF & VERKHOSHANSKY, 1999).

O conhecimento dos efeitos das cargas, assim como dos períodos de descanso necessários para restaurar o equilíbrio biológico, o tratamento específico das formas de treinar e a complexidade crescente do desporto contemporâneo, fizeram com que surgissem novas formas de organização estratégica, isto é, de planejamento e programação da forma mais eficiente do processo de treinamento (CAMPOS GRANELL, 2003).

A realização de um conjunto de avaliações e, mais ainda, o acompanhamento periódico do treinamento do atleta constituem os elementos necessários para sua própria evolução física, de acordo com as exigências da modalidade esportiva por ele praticada, dentro de padrões científicos nos quais o esporte de alto rendimento está hoje perfeitamente definido (SILVA *et al.*, 2002).

Para a monitoração dos treinos, são planejados alguns ciclos de treinamento, sendo estes um processo complexo, e têm sido utilizados diversas terminologias. MATVEEV (1981), classificou os ciclos como micro, meso e macro, onde o microciclo se refere à um conjunto de sessões de treinamento; mesociclos são classificados como vários microciclos com um treinamento; e macrociclos um conjunto de mesociclos com planejamentos semi-anual ou anual.

Para BOMPA (2001), em contraposição, o uso do termo microciclos para o plano de treinamento semanal é o macrociclo representando a fase de 2-6 semanas, uma vez que mesociclo não é usado por esse autor. O treinamento físico é desenvolvido primeiramente pelo treinamento físico geral, treinamento físico específico e por fim o aperfeiçoamento das capacidades biomotoras. Fundamentalmente a estrutura e os objetivos dos macrociclos vão ser traçados de acordo com o desporto. Macrociclos para o período de competição, em desportos coletivos com um ou dois jogos por semana, devem possuir um caráter de carga estável. A mudança de intensidade deve ocorrer durante o microciclo (semana), nos quais os jogos, a recuperação, e treinamento de baixa e média intensidade devem ser a norma (BOMPA, 2001).

A partir do modelo de Matveev os russos Arosiev e Kalinin propuseram a estruturação pendular, como esta estrutura é muito rígida De La Rosa (2001) propôs um modelo baseado na estrutura pendular, porém com uma proposta mais atual denominada de Sinos estruturais, assim chamada pelo seu idealizador o Prof. Dr. Armando Forteza De La Rosa.

Os sinos estruturais seguem os mesmos princípios da diferenciação entre as cargas gerais e específicas, porém em momento algum as cargas gerais estarão acima das cargas específicas, mesmo em momentos de carga especial mínima.

Outro método é sistema de treinamento em blocos proposto pelo Prof. Dr. Yuri V. Verkhoshanski, sendo denominado pelo próprio de moderna teoria e metodologia do treinamento desportivo. É proposto um grande ciclo de adaptação (GCA), que pode ser entendido como uma fase completa de desenvolvimento do organismo na qual é submetido a transformações, que servem de base para a passagem a um nível mais elevado da capacidade específica de trabalho do organismo. Verkhoshanski (1996) cita que na organização do GCA é necessário respeitar duas condições indispensáveis: Orientação concreta da carga de treinamento, (deve-se estabelecer as funções e os mecanismos energéticos específicos do desporto) e a formulação objetiva do resultado do treinamento (o objetivo concreto que se pretende obter).

O Modelo de Cargas Seletivas é proposto pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Gomes sendo dentre todos os modelos apresentados o mais específico para o futebol. Este modelo foi idealizado pelo grande número de jogos que dificulta distribuição de cargas durante o calendário anual. Na prática Gomes (2002) prevê um ciclo anual de 52 semanas que será dividido em duas etapas, sendo caracterizada uma periodização dupla com duração de 26 semanas cada. A estruturação das cargas de treinamento proposta deve ser organizada de acordo com os seguintes fatores: a) número de sessões na semana; b) tempo destinado ao treinamento no macrociclo; e c) total de horas destinadas ao mesociclo/macrosciclo. Segundo Gomes (2002) considerar a carga horária semanal para distribuição das capacidades de treinamento, facilitará na montagem da periodização do número de sessões destinadas a cada semana/mês do macrociclo.

O conhecimento existente sobre a planificação esportiva, assim como o controle do treinamento, é algo que não deveria escapar de nenhum profissional,

pois o futebol a cada dia torna-se um instrumento de investigação científica, fato este devido ao aumento da exigência desse esporte na atualidade, nas capacidades técnicas, físicas e táticas, em busca de resultados mais expressivos (MENEZES *et al.*, 2005). Diferente de esportes individuais, que teoricamente são mais fáceis de monitorar o treinamento, o futebol sendo uma modalidade coletiva, dificulta o controle da sistematização dos treinos, pois na maioria das vezes o plantel de jogadores é composto por cerca de 30 atletas independente da categoria, desafiando toda a comissão técnica, uma vez que cada jogador tem um nível de solicitação metabólica, que por sua vez exige e gera adaptações diferenciadas nos processos de produção de energia (REILLY, 1997), dependendo da função tática e da individualidade dos processos metabólicos dos mesmos.

A Periodização é dividida tradicionalmente em três períodos: Preparação, Competição e Transição ou Recuperação (SMITH, 2003a). O Período de Preparação é um período em que os atletas convivem um bom período de tempo treinando juntos antes das competições, em um local afastado de possíveis distrações, focalizando a atenção no trabalho (KROEFF *et al.* 2002). Dessa forma, a comissão técnica do clube pode controlar o ambiente de treinamento, tomando as precauções para o bom andamento das atividades (GOULD *et al.* 1999). Rotinas bem desenvolvidas e planejadas, antes e durante a competição, favorecem uma boa *performance* dos atletas (WILLIAM & KRANE, 1998).

Para jogadores profissionais, o Período de Preparação pode envolver o calendário de dois treinos por dia. Durante a temporada competitiva, a semana pode incluir um ou dois jogos (BURKE, 2006). No Brasil, os clubes realizam o período de preparação antes da temporada visando o aperfeiçoamento físico, técnico e tático da equipe para toda a temporada e raramente realizam um trabalho específico para uma competição. Isso pode ser atribuído às dificuldades do calendário dos jogos, onde os clubes disputam muitos torneios ao mesmo tempo, dificultando o planejamento de um programa de treinamento voltado para o sucesso em um determinado torneio. Outro momento é o Período de Competição, onde a preparação realiza-se em rigorosa conformidade com o calendário das competições, no qual os prazos de realização das principais competições têm significado especial (ZAKHAROV, 2003).

Uma sessão competitiva no futebol inclui semanas de microciclos consistindo de treinamento, competição e recuperação. Coletivamente, a demanda de dois a três jogos por semana elevam o estresse imposto aos jogadores, aumentando o risco de lesão, declínio do desempenho devido a fadiga, dano muscular e inflamação, porém na categoria juniores o número de jogos competitivos é de um por semana diminuindo os fatores maléficos à *performance* (SPIRLIDIS apud BILLINGS, 2008).

Na literatura são encontrados diversos estudos que procuraram estabelecer o comportamento fisiológico dos jogadores de futebol durante o jogo ou do treinamento, porém não está clara a fronteira entre as ciências biológicas e o treinamento desportivo, limitando portanto, o número de informações que buscam entender a funcionalidade das células do sistema imunitário desses atletas, relacionando o período de preparação ao período de competição. O propósito do presente estudo foi determinar através de análises sanguíneas a resposta leucocitária de jogadores de futebol, do início e ao término do Período de Preparação e ao final do Período de Competição.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi de analisar as respostas leucocitárias de jogadores de futebol da categoria juniores, através de coletas sanguíneas antes do Período de Preparação, após essa fase e ao final do Período de Competição.

3.2 Objetivos específicos:

- Mensurar a atividade fagocitária de neutrófilos.
- Mensurar a retenção lisossomal de neutrófilos.
- Mensurar as espécies reativas do oxigênio (peróxido de hidrogênio e ânion superóxido) produzidas por neutrófilos.
- Mensurar a proliferação de linfócitos sanguíneos.

4.0 METODOLOGIA

4.1 Sujeitos

O recrutamento da amostra foi realizado de forma sistemática (10 principais jogadores do elenco, para evitar perda amostral com dispensas). Essa foi composta por futebolistas do sexo masculino, com idade cronológica de 17 à 20 anos, categoria Juniores (sub 20), do Paraná Clube que é filiado e participante de competições organizadas pela Confederação Brasileira de Futebol (CBF). A Copa Tribuna de Futebol Junior organizada pela Federação Paranaense de Futebol, foi a competição analisada durante a presente pesquisa.

4.2 Instrumentos e procedimentos

Para a realização do estudo foi feita avaliação de parâmetros funcionais das células de defesa e de seus subtipos. Após a programação das atividades, em conjunto com a comissão técnica da equipe, foi esclarecido sobre a coleta e participação espontânea dos mesmos, manifestando seu consentimento mediante termo específico. O protocolo de pesquisa foi delineado conforme as diretrizes propostas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisas envolvendo seres humanos, e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o registro CEP/SD: 613.150.08.08 – CAAE: 0056.0.091.091-08.

4.3 Caracterização das atividades nos diferentes períodos de treinamento

Segundo o preparador físico da equipe Juniores do Paraná Clube, o Período Preparatório teve uma duração de seis semanas. Na primeira foi o período de preparação básica da parte física, envolvendo exercícios gerais, com pouca especificidade e com pouco envolvimento com bola. Outro aspecto trabalhado foi a

adaptação cardiorrespiratória através de treinamentos aeróbios fragmentados e neuromuscular com resistência muscular localizada (RML).

Na 2ª semana foi aplicada uma bateria de avaliações das aptidões fisiológicas, metabólicas e neuromotoras. Os treinamentos eram prescritos segundo os resultados dessas avaliações.

Na 3ª e 4ª semana o treinador iniciou sua intervenção com trabalhos envolvendo pequenos jogos, exercícios envolvendo técnicas fundamentais e treinamentos táticos.

Na 5ª e 6ª semana entrou a especificidade através de treinamentos por posição, distância percorrida por posição, complemento após os treinos em casos especiais.

No Período de Competição, houve um jogo por semana. O trabalho de força foi realizado na academia de musculação do clube 2 vezes por semana e 1 treinamento físico por semana no campo que ocorreu com ênfase em força e velocidade, com circuitos de velocidade, pliometria, tração, resistência de velocidade, caixa de areia. Treinos de técnicas fundamentais, técnico/tático e físico/técnico, totalizava uma média de cinco treinos por semana.

4.4 Coleta e separação das células sangüíneas

As coletas de sangue foram realizadas por um profissional habilitado, seguindo todos os preceitos éticos e normas de higiene e segurança. Foram retirados 10 ml de sangue em tubos (Vacutainer) previamente heparinizados, por punção venosa de cada atleta. As coletas foram realizadas no período entre 7:00h e 8:30min, para se evitar a influência das variações circadianas, e em estado de jejum “overnight”.

No laboratório os tubos foram centrifugados por 10min a 1200 rpm a 4 °C (Eppendorf modelo 410R). O plasma foi aliqotado e o restante transferido para outro tubo de 50 ml, sendo adicionado o mesmo volume de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em outro conjunto de tubos foi pipetado 3 mL de Ficoll-Paque (Sigma Diagnostics) e sobre estes acrescentados 8 mL de sangue diluído com PBS. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante

30 minutos a 12°C. Ao final desta, foi desprezada a fase superior e transferida a camada intermediária contendo as células mononucleares (Linfócitos e Monócitos) para outro tubo.

4.5 Isolamento de Neutrófilos Sangüíneos

O isolamento de neutrófilos foi realizado conforme proposto por BØYUM (1976). Os tubos contendo 3 mL de Ficoll-Paque PLUS mais 8 mL do sangue diluído em PBS foram centrifugados a 1.400 rpm a 18°C durante 40 min.

A camada inferior constituída por hemácias e células polimorfonucleares foi transferida para outro tubo. Submeteu-se a amostra, duas vezes, à lise hipotônica por incubação com solução hemolítica (Tris base (tris[hidroximetil]aminometano) 17,0 mM; NH₄Cl 18,7 mM) em banho-maria a 37°C por 15 min. A solução foi centrifugada a 1.200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células, ressuspendidas em PBS e contadas em câmara de Neubauer. Depois de isoladas, as células polimorfonucleares, representadas em sua maioria por neutrófilos, foram submetidas aos protocolos descritos mais adiante.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Metabolismo e Exercício da UFPR.

4.6 Determinação dos parâmetros imunitários

4.6.1 Reagentes e Enzimas

Todos os componentes dos tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A. Concanavalina A e o meio de cultura (RPMI 1640) foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St. Louis (EUA). O antibiótico (penicilina e estreptomicina) e o soro fetal bovino da Gibco-Brasil. Os anticorpos monoclonais utilizados foram obtidos da Clontech - BD Bioscience, EUA. A [2-¹⁴C]-timidina (50 mCi/mmol) foi obtida da New England Nuclear Research Products, (Du Pont Company – Biotechnology Systems – EUA).

4.6.2 Linfócitos

A camada constituída de hemácias e células polimorfonucleares foi transferida para tubos de 50 mL. Em seguida, foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Os linfócitos foram ressuspensos em PBS e ao final dessa houve a contagem das células em câmara de Neubauer.

4.6.3 Avaliação da capacidade proliferativa de células mononucleares sanguíneas

As células mononucleares predominantemente linfócitos ($1,4 \times 10^5$ células / poço) foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 μ L) a 37°C em atmosfera de 95% O₂ / 5% CO₂, por 66 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20 μ L/poço de solução (5 μ g/mL) do mitógeno concanavalina A (Con A), estimulador da proliferação de linfócitos T. Após 48h de cultivo, foram adicionados 20 μ L de uma solução contendo (2-14C)-timidina (0,02 μ Ci/poço) e as células cultivadas por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Ao final das 66 horas de cultivo, os linfócitos foram coletados automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papel de filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não houve necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papel contendo os linfócitos com a radioatividade incorporada ao seu DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para contagem (CPM-contagem por minuto) em contador Beckman LS 6500 (RAIDAL *et al.*, 1998).

4.7 Metodologia dos ensaios para células Polimorfonucleares (neutrófilos).

4.7.1 Soluções

Solução de tampão fosfato salina pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador foi o Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consistiu de ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro (Sigma) foi preparada pela dissolução de 20 mg de corante em 1 mL de DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma) e a solução para uso de rotina foi preparada pela diluição de 20 µL da solução estoque em 5 mL de PBS. A solução de vermelho fenol (Sigma), para os ensaios de produção de H₂O₂, consistiu de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/ml peroxidase “horseradish” (Sigma) em PBS pH 7,4 a 340 mOsm, e previamente foi adicionado 0,05% de zymosan (2,3 x 10⁸ partículas/mL - Sigma), para os ensaios de fagocitose. Foi obtido solução diluindo-se 40 mg de zymosan em 6 ml de PBS e adicionado 600 µL de vermelho neutro.

4.7.2 Capacidade fagocítica

Foi utilizado o método descrito por BONATTO *et al.* (2004). Cem µL de uma solução contendo 2 x 10⁶ células por mL foram depositados em microplaca de 96 poços. Adicionou-se 0,01 mL de solução contendo zimosan não-opsonizado (1,0 x 10⁸ partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 min a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 0,1 mL de fixador Baker para interromper o processo de fagocitose. Após 30 min, a microplaca foi lavada com PBS, visando remover as partículas de zimosan coradas não fagocitadas pelos neutrófilos. O vermelho neutro incorporado dentro dos fagossomos foi solubilizado, utilizando-se 0,1 mL de solução de extração e, após 30 min, procedeu-se a leitura da absorbância a 550 nm e os dados foram expressos em absorbância/2 x 10⁵ células.

4.7.3 Produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por PICK & MIZEL (1981) modificado. Através da oxidação de vermelho fenol foi possível detectar a produção de H₂O₂. Alíquotas de 1 ml de solução de

células (neutrófilos) e/ou 1 ml de éster de forbol miristato acetato (PMA – 20 mM) foram colocadas em placas tipo ELISA. Após 1 hora de incubação no escuro (para prevenir a foto-oxidação), o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e os poços receberam 100 µl da solução de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zymosan. Em seguida os neutrófilos foram incubados por mais 30 minutos e após o término deste tempo foi executada a leitura a 620 nm em espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad - Benchmark).

4.7.4 Mensuração do Ânion Superóxido

Os neutrófilos (150 µL) foram incubados por 1 hora com 0,1% de NBT e 10 µL de PMA (80 µM) em PBS a 37 °C. Esta reação foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. Esta mistura foi centrifugada rapidamente (30 segundos a 10.000 rpm) e o NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado em 300 µL de ácido acético a 50% e sonificado (1 pulso). Os restos celulares foram sedimentados e a absorbância do sobrenadante determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Ultrospec – 2000).

4.7.5 Conteúdo de vesículas catiônicas

Para esta análise foi utilizado o método descrito por BONATTO *et al.*, (2006), onde foi depositado 100 µL da solução de neutrófilos, 20 µL da solução estoque de vermelho neutro (20 mg de vermelho neutro em 1 ml de DMSO) a 2% em placas de 96 poços. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Foi adicionado 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro nos lisossomos. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente em lisossomos, fica aprisionado devido à mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Após 30 minutos, a absorbância foi mensurada a 550 nm utilizando-se o “Microplate reader Bio-rad” (Benchmark).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado o teste de D'Agostino & Pearson para testar a normalidade dos dados coletados. Medidas de tendência central e variabilidade foram utilizadas para a caracterização dos participantes do estudo. Para analisar os escores nos mesmos indivíduos em ocasiões sucessivas (Início do Período de Preparação e Período entre o final do Período de Preparação e início de competição) foi utilizado o teste "t" de Student pareado. Já para a análise entre os períodos de (Início do Período de Preparação, Transição entre Final do Período de Preparação e início de competição e final de competição) foi utilizado ANOVA one-way. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. Os procedimentos estatísticos do presente estudo foram realizados mediante a utilização do *Graph Pad Prism 5.0*.

5 – RESULTADOS

5.1 – Capacidade fagocítica.

A capacidade fagocítica dos neutrófilos dos jogadores de futebol da categoria juniores foi calculada como percentual referente ao Início do Período de Preparação (IPP). A capacidade fagocitária dos neutrófilos obtidos dos jogadores no Final do Período de Preparação (FPP) e do momento entre o Final do Período de Preparação (FPP) e o Início da Competição (IC) não foram diferentes ($P > 0,05$) (Figura 4a). Ainda, nessa variável analisada, não houve diferença significativa entre final da competição (FC) quando comparado percentualmente ao IPP ($P > 0,05$) (Figura 4b).

A capacidade fagocítica no IPP no período entre o FPP e IC não foi diferente entre os períodos ($P > 0,05$) e está apresentada na figura 4a.

Ao investigarmos a capacidade fagocítica no FC e comparados com o IPP e IC (figura 4b) também não foi encontrado diferença significativa entre os 3 períodos ($P > 0,05$).

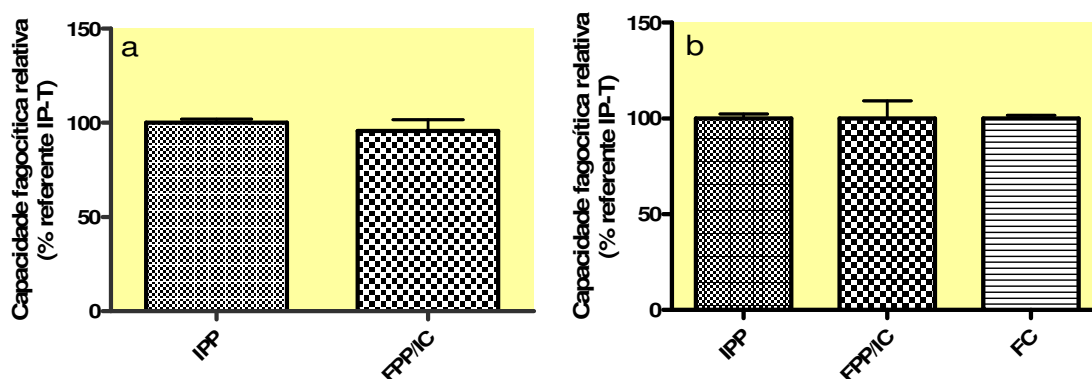


Figura 4 – Fagocitose de partículas de Zimozan por células polimorfonucleares sanguíneas (neutrófilos) obtidas de jogadores de futebol da categoria Juniores. (a) Dados dos períodos IPP e intervalo entre o FPP e IC (n=7). (b) Dados dos períodos IPP, intervalo entre o IPP e FC (n=5). Valores foram expressos em média \pm EPM como percentual referente ao IPP. Não houve diferença significativa entre as fases ($P > 0,05$).

5.2 Capacidade de Produção Relativa de Ânion Superóxido.

A produção de ânion superóxido (O_2^-) pelos neutrófilos dos jogadores, foi calculado como percentual referente ao IPP.

Os neutrófilos dos sujeitos participantes da pesquisa, não apresentaram alterações na produção relativa de O_2^- no FPP e IC em relação ao IPP ($P > 0,05$) (Figura 5a). Também, não houve diferença significativa no FC quando comparado ao IPP na Produção relativa de O_2^- ($P > 0,05$) (Figura 5b).

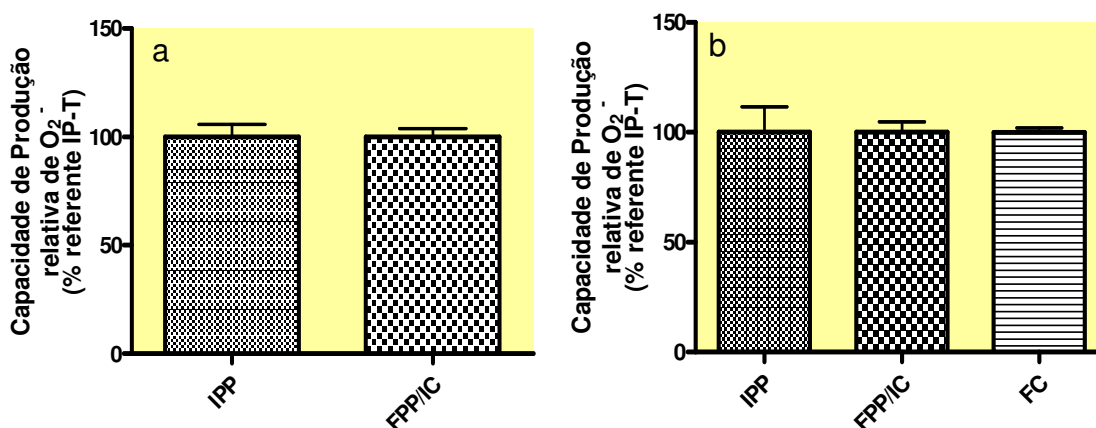


Figura 5 – Produção de O_2^- pelos neutrófilos de jogadores de futebol da categoria Juniores. (a) Dados dos períodos IPP e intervalo entre FPP e IC ($n=7$). (b) Dados dos períodos IPP, intervalo entre o FPP e IC e FC ($n=5$). Valores foram expressos em média \pm EPM como percentual referente ao IPP. Não houve diferença significativa entre as fases ($P > 0,05$).

5.3 Volume lisossomal

Volume lisossomal dos neutrófilos dos jogadores de futebol da categoria juniores foi calculada como percentual referente ao IPP. O volume lisossomal dos neutrófilos obtidos dos jogadores no IPP e intervalo entre o FPP e IC não foram diferentes ($P > 0,05$) (Figura 6a). Ainda, nessa variável analisada, não houve diferença significativa entre o FC quando comparado percentualmente ao IPP ($P > 0,05$) (Figura 6b).

O volume lisossomal no IPP e intervalo entre o FPP e IC não foi diferente entre os períodos ($P > 0,05$) e está apresentada na figura 6a.

Ao investigarmos o volume lisossomal no FC e comparados com o IPP e IC (figura 6b) também não foi encontrado diferença significativa entre os 3 períodos ($P > 0,05$).

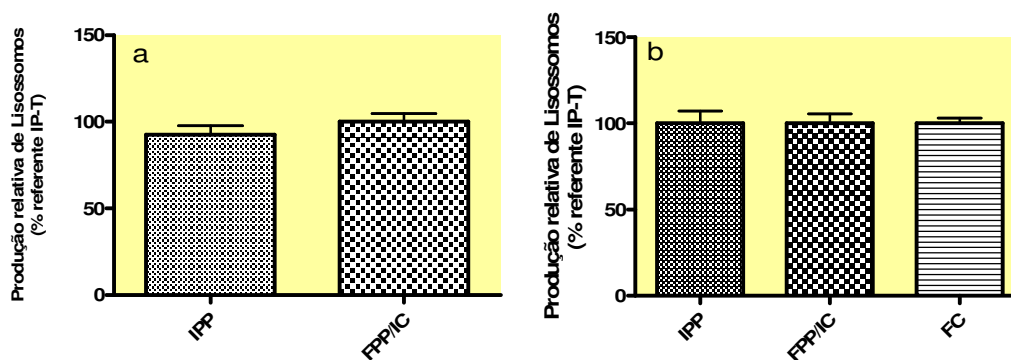


Figura 6 – Volume lisossomal de células polimorfonucleares sanguíneas (neutrófilos) obtidas de jogadores de futebol da categoria Juniores. (a) Dados dos períodos IPP e intervalo entre o FPP e IC ($n=7$). (b) Dados dos períodos IPP, intervalo entre o FPP e IC e FC ($n=5$). Valores foram expressos em média \pm EPM como percentual referente ao IPP. Não houve diferença significativa entre as fases ($P > 0,05$).

5.4 Produção relativa de H₂O₂

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelos neutrófilos dos jogadores, foi calculado como percentual referente ao IPP.

Os neutrófilos dos sujeitos participantes da pesquisa, não apresentaram alterações na produção relativa de H₂O₂ no FPP e IC em relação ao IPP ($P > 0,05$) (Figura 7a). Também, não houve diferença significativa no FC quando comparado ao IPP na Produção relativa de O₂⁻ ($P > 0,05$) (Figura 7b).

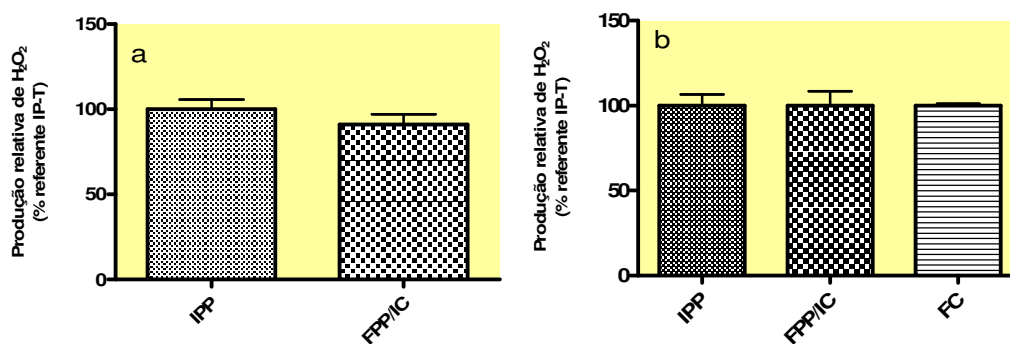


Figura 7 – Produção de H₂O₂ pelos neutrófilos de jogadores de futebol da categoria Juniores. (a) Dados dos períodos IPP e intervalo entre o FPP e IC (n=7). (b) Dados dos períodos IPP, intervalo entre o FPP, IC e FC (n=5). Valores foram expressos em média ± EPM como percentual referente ao IPP. Não houve diferença significativa entre as fases ($P > 0,05$).

Sistema imune adaptativo específico:

5.5 Proliferação Linfocitária

Os dados estão apresentados como índice de proliferação celular em relação a ausência de estímulo com Concanavalina A.

No IPP, o índice proliferativo dos linfócitos foi de 48 vezes. No FPP e IC houve redução significativa ($P < 0,001$) da proliferação. Onde o índice foi de 1,1 vezes. No FC a proliferação foi significativamente elevada (índice de 3 vezes) quando comparada ao período entre o FPP e IC ($P < 0,001$).

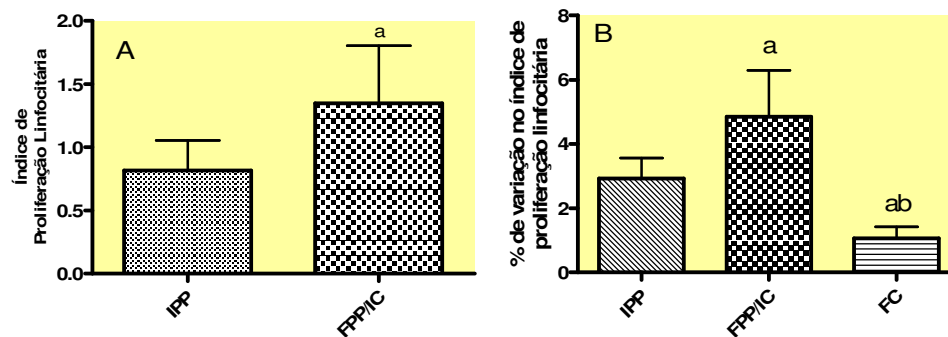


Figura 8 – Percentual de variação no índice de proliferação dos linfócitos, após 66 horas de cultivo, na presença do mitógeno concanavalina A (Con-A - 5 μ g/mL). (a) Dados dos períodos IPP, intervalo entre o FPP e IC (n=7). (b) Dados dos períodos IPP, intervalo entre o FPP e FC (n=4). Valores foram expressos como média \pm EPM do percentual referente ao IPP (N = 4). ^a $P < 0,05$ quando comparado ao IPP. ^b $P < 0,05$ quando comparado com o período FPP e IC.

6 - DISCUSSÃO

Já está bem estabelecido na literatura que o exercício físico agudo altera o número de leucócitos circulantes após exercício físico (PEAKE *et al.*, 2004; TAULER *et al.*, 2004; YAMADA *et al.*, 2002). A maioria dos estudos encontrados na literatura científica, que envolvem jogadores de futebol e resposta imunológica são de caráter agudo não havendo um acompanhamento da resposta a longo prazo (MALM, EKBLÖM & EKBLÖM, 2004) e (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008), como o presente estudo.

Muitos aspectos da relação existente entre exercício físico e imunidade ainda não estão totalmente esclarecidos (LEANDRO *et al.*, 2002). Fatores como: o período de avaliação e da resposta imunológica devem ser considerados (MACKINNON, 1998).

Existe uma falta de dados sobre a influência do stress crônico sobre a fisiologia de atletas de elite (REINKE *et al.*, 2009).

Dentre os 10 indivíduos participantes da pesquisa, 6 completaram o estudo e os demais quatro tiveram o seguinte destino: 1 (um) jogador pediu dispensa, 1 (um) jogador foi submetido a uma cirurgia de púbis, uma semana antes da coleta de sangue e 2 (dois) jogadores foram promovidos para a categoria profissional no meio da competição.

Atletas de futebol de elite são mais vulneráveis a traumas induzidos por exercícios, devido ao aumento de jogos e treinos para o cumprimento de calendários pré-estabelecidos (ISPIRLIDIS, 2008). Como fator de segurança na preparação de futebolista é sugerida uma adequada estruturação das sessões de treinamento, relação apropriada entre jogos/treinamento e redução/controle das cargas de treinamento (DVORAK e JUNGE, 2000).

Além da imunidade inata, mediada por macrófagos e neutrófilos, a defesa do organismo às infecções também envolve os linfócitos - imunidade adquirida. Uma forma de se avaliar a função linfocitária é mensurar a taxa de proliferação dessas células em resposta a um mitógeno, no caso a Con-A.

Contudo, MILES *et al.*, (2003) verificaram que mulheres submetidas a seis semanas de treinamento com pesos não foi capaz de alterar a resposta proliferativa de linfócitos T sangüíneos estimulados com Con A ou com PHA ao exercício físico

agudo, consistindo de seis séries de 10 RM com dois minutos de intervalo. Esses resultados corroboram com o da presente pesquisa, porém diferem na modalidade esportiva, sujeitos e intensidade dos exercícios.

Analisando somente efeitos crônicos do treinamento com pesos, MILES *et al.*, (2002) verificaram tendência a menor proliferação de linfócitos T estimulados com PHA após seis semanas de treinamento tanto utilizando protocolo para força e potência quanto protocolo para hipertrofia em mulheres, enquanto linfócitos estimulados com Con A, bem como mitógeno *pokeweed* (estimulador de linfócitos B) não apresentaram modificação significativa.

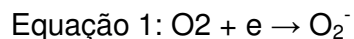
No presente estudo, houve mudanças na capacidade de proliferação linfocitária quando o intervalo entre o Final do Período Preparatório e Início da Competição e Final da Competição, quando comparados ao Período de Preparação.

Recentemente, um estudo epidemiológico sobre a incidência de infecções e atividade física habitual, reportou que a prática regular de duas horas de exercício moderado por dia estava associada com 29% no aumento da redução de risco de infecções no trato respiratório superior, comparados com o risco de infecção associado com o estilo de vida sedentário (MATTHEWS *et al.*, 2002).

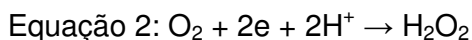
Exercício intenso gera espécies reativas de oxigênio, produzindo estresse oxidativo (MARGONIS *et al.*, 2007).

O futebol aumenta a resposta oxidativa em como parte da resposta inflamatória de lesão muscular induzida pelo exercício (SPIRLIDIS, 2008).

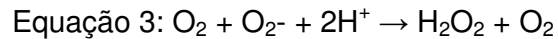
In vivo, enzimas geralmente usam um elétron no período que realizam reduções multieletrônicas de O_2 . Se um simples elétron é aceito, ele deve entrar numa orbital e produzir O_2^- (BAYIR, 2005).



A redução de dois elétrons do O_2 mais a adição de 2 prótons (H^+) gera H_2O_2 .



Muitas oxidases usam este mecanismo para reduzir o O_2 diretamente para H_2O_2 . A dismutação espontânea ou catalisada do O_2^- pela superóxido-dismutase também produz H_2O_2 .



O peróxido é um intermediário não-radical que oxida ampla variedade de meios biológicos, apesar de ser uma espécie não-reativa (ADERBAL *et al.*, 2007).

Um estudo recente com 18 jogadores caracterizados pelos autores como pré-profissionais de futebol que jogaram durante 60 minutos durante um treinamento, foram divididos em três grupos dependendo da intensidade durante o exercício: baixa, média e alta intensidade. O objetivo dos autores foi investigar como a intensidade do exercício, influencia a resposta antioxidante de leucócitos e o início de danos oxidativos celulares. Os resultados encontrados foram um aumento significativo na produção de H_2O_2 no grupo com alta intensidade. A contagem de neutrófilos e produção de espécies reativas de oxigênio aumentaram progressivamente com a intensidade do exercício. Os autores concluíram que a intensidade do exercício afeta o equilíbrio de oxidantes e antioxidantes de linfócitos e neutrófilos, mas somente o exercício de alta intensidade inicia danos oxidativos celulares (SUREDA *et al.*, 2009).

Habitualmente, tal fato não ocorre com o atleta que pratica o exercício dentro de limites que não sejam um “estresse” orgânico e psíquico constantes (COSTA ROSA & VAISBERG, 2002).

A resposta de neutrófilos ao exercício crônico está na dependência da intensidade do treinamento. Assim, o exercício moderado acarreta aumento dessas células, que se mantém mesmo durante o repouso. Exercício de alta intensidade provoca queda do número de neutrófilos (COSTA ROSA & VAISBERG, 2002).

Quanto à capacidade funcional dos neutrófilos, existe uma controvérsia grande na literatura e, enquanto alguns autores demonstram diminuição da produção dos reativos intermediários do oxigênio e diminuição da capacidade microbicida, outros autores demonstram maior capacidade quimiotática e da fagocitose (COSTA ROSA & VAISBERG, 2002).

Segundo dados levantados juntamente com o Departamento Médico do Clube no IC, houve 06 registros de lesões em diferentes jogadores no FPT e IC como: estiramento muscular, síndrome compartimental, dor articular no joelho, entorse de tornozelo, contusão na perna e contusão no ombro.

PEDERSEN e BRUUSGAARD (1995) relatam que a imunossupressão observada é apenas evidente quando o exercício físico é intenso e de longa duração (60 min ou mais). Segundo as informações obtidas pelo preparador físico da equipe pesquisada, os treinos durante o Período Preparatório, tinham uma duração em média de 90 minutos. Já durante o período de competição, a duração era em média de 120 minutos, ambos com pausas para descanso e reposição hídrica.

Em estado de repouso, a função imunitária aparenta de maneira geral, similar em atletas quando comparados com não atletas. Entretanto, o número de leucócitos circulantes e função dos neutrófilos são geralmente menores em atletas de *endurance* em estado de repouso quando comparados com pessoas sedentárias (GLEESON, 2007). Segundo os resultados da presente pesquisa, jogadores de futebol da categoria sub-20 não demonstraram diferenças significativas na funcionalidade de neutrófilos mas apenas no índice de proliferação linfocitária ($p < 0,05$).

MALM & EKBLÖM (2004) pesquisaram as mudanças nas subpopulações em leucócitos e monócitos em 10 jogadores masculinos de futebol, com idades entre 16 e 19 anos. O objetivo foi de investigar alterações em resposta a dois jogos consecutivos separados por 20 horas. Segundo os autores, os grandes achados do estudo foram: (1) os resultados mostraram que o treinamento aeróbico pode diminuir as alterações imunológicas induzidas pelo exercício físico, (2) pelo menos 72 h são necessários para normalizar as variáveis imunológicas depois de dois jogos consecutivos de futebol.

Uma pesquisa feita por MALM, EKBLÖM e EKBLÖM (2004) em jogadores de elite da categoria Juniores na Suécia, durante cinco dias de treinamento em um camp, resultou em uma diminuição significativa de linfócitos T e B, mas não houve mudança no número total de leucócitos e de células NK comparados com valores antes do camp.

Parâmetros imunológicos não respondem similarmente ao mesmo estímulo do exercício. Além disso, a magnitude e direção da mudança de parâmetro imune

depende da dose do exercício (duração, intensidade) e do nível de aptidão física do sujeito (MACKINON, 2000). Como na maioria dos estudos envolvendo resposta leucocitária e exercício são de caráter agudo, houve mudanças significativas em vários parâmetros, no presente estudo não houve diferença significativa quando houve um acompanhamento dos diferentes momentos da periodização.

Já está bem definido que o exercício físico, enquanto modelo mensurável de indução de stress, provoca alterações funcionais no sistema imunológico, (PYNE & GLEESON, 1998).

Neutrófilos representam 50-60% do pool de leucócitos circulantes, fazem parte da primeira linha de defesa do organismo contra infecções e tem papel importante na resposta imunitária a lesões teciduais (PEAKE, 2002).

A tolerância do atleta ao estresse é determinada pela sua capacidade de adaptação, estratégias de competição e características fisiológicas. A quantidade total de fatores estressantes internos e externos determina a maior vulnerabilidade de alguns atletas (SILVA *et al.*, 2004).

Um estudo com 24 jogadores (idade, $20,1 \pm 0,8$ anos; altura, $1,78 \pm 0,08$ m; peso $75,2 \pm 6,8$ kg), cujo objetivo era analisar o efeito de um jogo de futebol sobre indicadores de *performance*, lesão muscular e inflamação durante seis dias de recuperação. Os jogadores foram divididos em grupo experimental que participaram do jogo ($n=14$) e grupo controle que não participaram do jogo ($n=10$). Os resultados demonstraram que uma partida de futebol induz danos musculares ativando respostas inflamatórias. A fase aguda da resposta inflamatória no futebol parece seguir o mesmo padrão em outras formas de exercício. Os resultados indicaram claramente a necessidade de recuperação suficiente para jogadores de futebol após um jogo (ISPIRDILIS *et al.*, 2008).

No período preparatório da equipe do Paraná Clube no ano de 2008 foi criado e desenvolvido as premissas para o aparecimento da forma desportiva, assegurando a sua consolidação. A primeira etapa foi subdividida em mais dois períodos: o de preparação geral e específica, possibilitando a melhoria da funcionalidade e a adaptação do atleta.

No final do Período de Transição (férias) e início do Período de Preparação, foi feita a primeira coleta de 10 ml de sangue em jejum às 8 horas da manhã. A segunda foi realizada no final do Período de Preparação e início do Período de

Competição, já a terceira, foi após a participação no campeonato (Período de Competição).

Alguns estudos demonstraram mudanças em algumas variáveis imunológicas durante diferentes períodos de treinamento e variações a respostas da intensidade e duração de exercícios (MALM, EKBLOM e EKBLOM, 2004).

Estudos acima mencionados diferem muito quanto ao delineamento experimental, o que dificulta a comparação entre seus resultados e os encontrados na presente pesquisa. Vale ressaltar que o período experimental (acompanhamento à longo prazo) pode ser um importante contribuinte para as diferenças entre os estudos, uma vez que a maioria deles foram feitos através de respostas agudas ao exercício, onde os sujeitos eram jogadores profissionais e submetidos a diferentes cargas de treinos e jogos.

7. CONCLUSÃO

- Os neutrófilos (sistema imunológico inato) obtidos dos jogadores nos períodos de Início do Período de Preparação, intervalo entre o Final do Período de Preparação (FPP), Início de Competição (IC) e Final da Competição (FC) não apresentaram diferença significativa quanto a fagocitose, volume lisossomal e produção de H_2O_2 e O_2^- .
- A proliferação linfocitária (sistema imune adquirido) dos linfócitos do sangue dos atletas diminuiu drasticamente entre o Final do Período de Preparação (FPP) e Início de Competição (IC) e recuperou parcialmente no Final da Competição (FC).

8.0 ORÇAMENTO

Foi utilizado as instalações e equipamentos para as avaliações fornecidos pelo Laboratório de Metabolismo e Exercício do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os kits e soluções utilizados nos exames laboratoriais foram disponibilizados pela instituição por preços vigentes de mercado não cabendo nenhum custo ao pesquisador.

Qualquer custo adicional que porventura ocorreu para a realização da pesquisa foi suprido pelo laboratório de Metabolismo e Exercício da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

9.0 CRONOGRAMA

ANO	MÊS	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	AUTORIZAÇÃO	APROVAÇÃO NA DISCIPL. MET. DE PESQ.	AD-HOC	COMITÊ DE ÉTICA	COLETA SANGÜÍNEA	ANÁLISE	TABULAÇÃO DOS DADOS	REDAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	QUALIFICAÇÃO	DEFESA FINAL	CORREÇÕES
2007	MAR.												
2007	ABR.												
2007	MAI.												
2007	JUN.												
2007	JUL.												
2007	AGO.												
2007	SET.												
2007	OUT.												
2007	NOV.												
2007	DEZ.												
2008	JAN.												
2008	FEV.												
2008	MAR.												
2008	ABR.												
2008	MAI.												
2008	JUN.												
2008	JUL.												
2008	AGO.												
2008	SET.												
2008	OUT.												
2008	NOV.												
2008	DEZ.												
2009	JAN.												
2009	FEV.												
2009	MAR.												
2009	ABR.												
2009	MAI.												
2009	JUN.												

10.0 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H. F. R., ALMEIDA, D.C. M., GOMES, A. C. Aspectos multidimensionais da forma desportiva: uma ótica contemporânea. **Rev. Trein. Desportivo.5:** 2, 44 – 50, 2000.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION REPORTS. Position of the American Dietetic Association and the Canadian Dietetic Association: Nutrition for physical fitness and athletic performance for adults. **Journal of the American Dietetic Association**, v.93, p.691-96, 1993.
- ADERBAL, S. AGUIAR Jr. e RICARDO A. Pinho. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Rev Bras Med Esporte**. Vol. 13, Nº 5 – Set /Out, 2007.
- BANGSBO, J. MOHR, M & KRUSTRUP, P. Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player. **Journal of Sports Sciences**, July 2006; 24(7): 665 – 674.
- BANGSBO, J. Energy demands in competitive soccer. **J. Sports Sci.** 12 spec. no. S5-12, 1994.
- GLEESON, M. Immune system adaptation in elite athletes. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 9:659–665, 2006.
- GLEESON, M. Biochemical and immunological markers of overtraining. **Journal of Sports Science and Medicine**. Vol 1, p.31-41. 2002.
- GOMES, A. C. **Treinamento Desportivo: estruturação e periodização**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- REILLY, T. An ergonomics model of the soccer training process. **Journal of Sports Sciences**; 23(6): 561 – 572, 2005.
- REILLY, T. *Energetics of high-intensity exercise (soccer) with particular reference to fatigue*. **J Sports Sci**. 1997;15:257-63.
- BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Crit Care Med**. 2005;33:498-501.
- BERRIDGE, M.J. Lymphocyte activation in health and disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 17, p. 155-178, 1997.
- BOMPA, T. **Periodização: Teoria e Metodologia do Treinamento**. , São Paulo. Phorte ed, 2001.
- BONATTO, S. J. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, v. 231, n. 1-2, p.56-62, set/out. 2004.

BORGHANS, J.A.M.; NOEST, A.J.; DE BOER, R.J. How specific should immunological memory be? **Journal of Immunology**, v. 163, n.2, p. 569-575, 1999.

BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 5, p. 9-15, 1976.

BURKE, L.M., LOUCKS, A.B. & BROAD, N. Energy and carbohydrate for training and recovery. **Journal of Sports Sciences**, July 2006; 24(7): 675 – 685.

CALDER, P.C. N-3 fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? **Nutrition Research**, v. 21, p. 309-341, 2001.

CAMPOS GRANELL. **Teoria e planejamento do treinamento desportivo**. José Campos Granell e Víctor Ramón Cervera; trad. Ronei Silveira Pinto e Margaret Daros Pinto - Porto Alegre: Artmed, 2003.

CHAPLIN, D.D. Overview of the human immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 430-435, 2006.

COSTA ROSA, L.F.P.B. & VAISBERG, M.W. Influências do exercício na resposta imune. **Rev Bras Med Esporte**. Vol. 8, Nº 4 – Jul/Ago, 2002.

DANTAS, E.H.M. **Periodização do treinamento. A prática da preparação física**. p. 63- 71, 2003.

DANTAS, E.H.M. **A prática da preparação física**. 3ed. Rio de Janeiro: Shape 1995.

DE LA ROSA, A. F. **Treinamento desportivo: carga, estrutura e planejamento**. 1. ed. São Paulo: Phorte, 2001.

DE OLIVEIRA, A.L.B. SEQUEIROS, J.L.S. DANTAS, E.H.M. Estudo Comparativo Entre o Modelo de Periodização Clássica de Matveev e o Modelo de Periodização por Blocos de Verkhoshanski. **Fitness & Performance Journal**, v. 4, n. 6, p. 359, 2005.

DVORAK, J e JUNGE, A. Football injuries and physical symptoms: a review of the literature. **American Journal of Sports Medicine**, 28 (5), s 3-9, 2000.

FEBBRAIO, M.A.; PEDERSEN, B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB J**. 16: 1335-1347, 2002.

GLEESON, M. Immune system adaptation in elite athletes. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 9:659–665, 2006.

GLEESON M, editor. Immune function in sport and exercise. Advances in Sport and exercise science series. **Edinburgh**, UK: Elsevier; 2007.

GROSS JD. Hardness and mood disturbances in swimmers while overtraining. **Journal of Sports and Exercise Psychology**;16:135-49, 1994.

GOULD, D, GUINAN, D. GREENLEAF, C., MEDBERY R. & PETERSON, K. (1999). Factors affecting olympic performance: Perceptions of athletes and coaches from more and less successful teams. **The Sports Psychology**, 13, 371-394.

GRIMBLE, R.F. Dietary lipids and the inflammatory response. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 535-542, 1998.

HUG, M. *et al.* Training modalities: over-reaching and over-training in athletes, including a study of the role of hormones. **Clin. Endocrinol. Metab.**, v.17, p. 191-209, 2003.

ISPIRLIDIS, I. *et al.* Time-course of Changes in Inflammatory and Performance Responses Following a Soccer Game. **Clin J Sport Med** 2008;18:423–431.

JAKERMAN, P. Base fisiológica de la puesta a punto. **STADIUM**, v. 28, n. 163, p. 19, 1994.

KROEFF, D.A. CORRÊA, J.C.A. DUARTE, L.R.S. STREY, M.N. Excelência na Produtividade: A Performance dos Jogadores de Futebol Profissional. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, 2002, 15(2), pp. 447-460.

LEANDRO, C, *et.al.* Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, 2002, vol. 2, nº 5 [80–90].

MACKINNON L.T. Immunity in athletes. **Int. J. Sports Med.** 18: 62-68, 1997.

MACKINNON LT (1998). Future directions in exercise and immunology: regulation and integration. **Int. J. Sports. Med.**; 19: S205-S211

MACKINNON L.T.. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: Overtraining effects on immunity and performances in athletes. **Immunology and cell biology.** 78 (5): 502-509, 2000.

MALM, C. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. **Scand J Med Sci Sports** 2006: 16: 4–6.

MALM, C. EKBLÖM, Ö. EKBLÖM, E. Immune system alteration in response to increased physical training during a Five Day soccer training camp. **Int J Sports Med** 2004; 25: 471 – 476.

MARGONIS, K. FATOUROS, IG. JAMURTAS, AZ., et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free Rad Biol Med.** 2007;43:901–910.

MATVEEV, L. **Fundamentals of sports training.** [English translation of the revised Russian edition]. Moscow: Progress Publishers, 1981.

MATTHEWS CE, OCKENE IS, FREEDSON PS, et al. Moderate to vigorous physical activity and the risk of upper-respiratory tract infection. **Med Sci Sports Exerc** 2002; 34:1242–1248.

MC. FARLANE, B. **Principios básicos de la Periodizacion del entrenamiento deportivo.** Ed. stadium, Buenos Aires, 1986.

MENEZES, R.P. MISUTA, M.S. FIGUEROA, P.J. CUNHA, S.A. BARROS, R.M.L. **Variabilidade da representação por componentes principais das posições de jogadores de futebol.** XI Congresso Brasileiro de Biomecânica (2005).

MEEUSEN, R. WATSON, P. DVORAK, J. The brain and fatigue: New opportunities for nutritional interventions? **Journal of Sports Sciences**, July 2006; 24(7): 773 – 782.

MILES, M. P. et al. Effects of resistance training on resting immune parameters in women. **European Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 6, p. 506-508, out.2002.

MILES, M. P. et al. Strength, workload, anaerobic intensity and the immune response to resistance exercise in women. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 178, n. 2, p. 155-163, jun. 2003.

MUJIKKA, I. et al. Creatine supplementation and sprint performance in soccer players. **Medicine science of Sports Exercise**, v.32, p. 518-25, 2000.

NICHOLAS, C.W.; NUTTAL, F.E. & WILLIAMS, C. The Loughborough Intermittent Shuttle Test: A field test that simulates the activity pattern of soccer. **Journal of Sports Sciences**, v. 18, p.97-104, 2000.

NIEMAN D.. Exercise immunology. Nutritional countermeasures. **Can. J. Appl. Physiol.** 26: 45-55, 2001a.

NIEMAN, D. Does exercise alter immune function and respiratory infections? **President's Council on Physical Fitness and Sports.** 13: 1-8, 2001b.

NIEMAN, D. Is infection risk linked to exercise workload? **Medicine & Science in Sports & Exercise.** Vol. 32, Nº 7, Suppl., pp. S406-S411, 2000.

NIEMAN, D. & NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L. The immune response to exercise. **Semin Hematol.** 1994;31:166-79.

NIEMAN D.C., PEDERSEN B.K.. Exercise and immune function. **Sports Med.** Feb. 27: 73-80, 1999.

PEAKE, J.; WILSON, G.; HORDERN, M.; SUZUKI, K.; YAMAYA, K.; NOSAKA, K.; MACKINNON, L.; COOMBES, J. S. Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate- and highintensity exercise. **J Appl Physiol** 97: 612-618, 2004.

PEAKE, J. M. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. **Exercise Immunology Review**, v. 8, p. 49-100, 2002.

PEDERSEN BK, BRUUNSGAARD H. (1995). How physical exercise influences the establishment of infections. **Sports Med** 19:193-400.

PEDERSEN, B.K.; TOFT, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br. J. Sports Med.** 34:246-51, 2000.

PICK & MIZEL. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**; 46 (2):211-26, 1981.

PYNE D.B e GLEESON M. (1998). Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. **Int J Sports Med** 19:138-194.

RAIDAL, S.L.; BAILEY, G.D.; LOVE, D.N. Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood and bronchoalveolar lavage derived leukocytes. **Vet. J.**, v.156, p.117-126, 1998.

REINKE, S. KARHAUSEN, T. DOEHNER, W. TAYLOR, W. HOTTENROTT, K, et al. (2009) The Influence of Recovery and Training Phases on Body Composition, Peripheral Vascular Function and Immune System of Professional Soccer Players. **PLOS ONE** 4(3): e4910. doi:10.1371/journal.pone.0004910.

SHARP, N.C.C., KOUTEDAKISY. **Sports and the overtraining syndrome.** Immunological aspects. British Medical Bulletin 48: 518-533, 1992.

SIFF, M.C. VERKHOSHANSKY, Y.V. **Supertraining.** 4th ed. Denver (CO): Supertraining International, 1999.

SILVA, P,R,S. et. al. Aspectos descritivos da avaliação funcional de jogadores de futebol. **Rev Bras Ortop.** Vol. 37, Nº 6 – Junho, 2002.

SILVA, A. et all. Compreendendo o overtraining no desporto: da definição ao tratamento. **Rev Port Cien Desp** (2004) 6(2) 229–238.

SMITH, D.J. A Framework for Understanding the Training Process Leading to Elite Performance. **Sports Med**; 33 (15): 1103-1126, 2003.

SMITH, L.L. Overtraining, Excessive Exercise, and Altered Immunity. **Sports Med**; 2003; 33 (5): 347-364.

SUREDA, A. FERRER, MD. TAULER, PE. ROMAGUERA, D. DROBNIC, F. PUJOL, P. TUR, JA. PONS, A. Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players. **Br J Sports Med**. 2009 Mar;43(3):186-90.

TAULER, P. et al. Different effects of exercise tests on the antioxidant enzyme activities in lymphocytes and neutrophils. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, n. 8, p. 479-484, ago. 2004.

TUBINO, M.J.G. **Metodologia científica do treinamento desportivo**. São Paulo. *Ibrasa*, 1979.

VERKHOSHANSKI, Y. V. *Problemas atuais da metodologia do treino desportivo*. **Revista Treinamento Desportivo**, v. 1, n. 1, p. 33-45, 1996.

WILLIAM, J. M. KRANE, V. (1998). **Psychological characteristics of peak performance**. Em J. M. Willians (Org.), *Applied sport psychology: Personal growth to peak performance* (pp. 191-222). Mountain View, CA: Mayfield.

YAMADA, M. et al. Raised plasma G-CSF and IL-6 after exercise may play a role in neutrophil mobilization into the circulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n.5, p. 1789-1794, mai. 2002.

ZAKHAROV, A.A. **Ciência do treinamento desportivo: aspectos teóricos e práticos da preparação do desportista, organização e planejamento do processo do treino: controle da preparação do desportista**. Andrei Anatolovitch Zakharov; organização e adaptação Antonio Carlos Gomes. – 2ed. Atual. E ampl. Rio de Janeiro: Palestra Sport, 2003.

11.0 APÊNDICE

10.1 Documento feito para solicitar a permissão da execução das avaliações nos jogadores da categoria Juniores do Paraná Clube.



PARANÁ CLUBE

Coordenação Geral das Categorias de Base

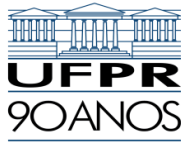
Declaramos para devidos fins, e a quem possa interessar que, DIOGO CRISTIANO NETTO, RG nº 8.752.402-7, CREF nº 01037-G/PR, aluno regularmente matriculado no Programa de Pós-graduação da Universidade Federal do Paraná – Mestrado em Fisiologia da Performance, sob orientação do professor Luiz Cláudio Fernandes, está autorizado a efetuar sua pesquisa de dissertação, durante a pré-temporada do ano de 2008, nos atletas das categorias de base do presente clube, uma vez que o Paraná Clube fornecerá os hemogramas completos dos jogadores participantes da pesquisa, sem custo ao pesquisador. Serão realizadas 03 (três) coletas, no início e final da pré-temporada e a outra no final do primeiro campeonato em que a categoria Juniores participar. Em troca desse procedimento o pesquisador deverá fornecer os todos os resultados das análises, à coordenação de preparação física.

Sem mais,

Curitiba, 14 de Fevereiro de 2008

 _____ HAMILTON TAVARES Coordenador Geral (Categorias de Base) PARANÁ CLUBE	 _____ RODRIGO REZENDE Coordenador (Preparação Física)
---	---

11.2 TERMO DE CONSENTIMENTO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM FISILOGIA DA PERFORMANCE

Você, jogador de futebol pertencente à equipe Juniores do Paraná Clube, está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “**RESPOSTA LEUCOCITÁRIA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SANGÜÍNEOS DE JOGADORES DE FUTEBOL. ANÁLISE DA FASE PREPARATÓRIA À FASE DE COMPETIÇÃO**”. É através das pesquisas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.

- a) O objetivo desta pesquisa é investigar a resposta das células do sistema de defesa do corpo humano e da composição do sangue, durante três períodos distintos, separados entre: início do Período de Preparação, início e final do Período de Competição.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário assinar o seu termo de consentimento livre e esclarecido antes do início das coletas.
- c) Como em qualquer coleta de sangue, você poderá experimentar algum desconforto, principalmente relacionado ao desconforto de agulhadas, punção, etc.
 - a) Para tanto você deverá comparecer antes do seu treino habitual, no Centro de Treinamento das Categorias de Base do Paraná Clube no Bairro Boqueirão, onde durará aproximadamente meia hora.
- d) Contudo os benefícios esperados serão o conhecimento do seu organismo relacionado aos seguintes fatores:

Você estará ajudando em relação à sua equipe nos seguintes termos:

1. Planejamento dos treinamentos
 2. Saber qual a carga (intensidade) de treinamento para temporadas posteriores.
 3. Conhecimento do seu estado físico.
- b) O pesquisador Diogo Cristiano Netto **CPF:** 30611085801 poderá ser encontrado no seguinte endereço durante todos os dias no

período da noite das 19 às 21hs. Rua Recife, 1426 – **Bairro:**
Cabral - **Cep:** 80060-000 **Cidade:** Curitiba – PR.

- c) **Fones:** Celular: 41-8856-6183 durante todo o dia.
d) **e-mail:** diogonetto7@gmail.com

- e) Caso sinta algum desconforto durante a coleta, a enfermeira que estará fazendo a coleta fará os primeiros socorros.
- f) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.
- g) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de se recusar a participar ou, se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.
- h) Todas as informações que forem divulgadas em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **confidencialidade** seja mantida.
- i) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não são da sua responsabilidade.
- j) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no mesmo local pela enfermeira que estará coletando o sangue. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

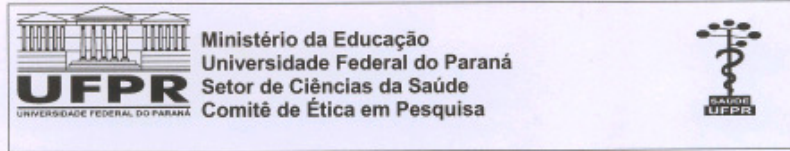
Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e que isso não afetará em desligamento do clube.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

NOME DO SUJEITO DA PESQUISA _____
ASSINATURA _____ /_ /_
LOCAL, DATA

NOME DO PESQUISADOR
DIOGO CRISTIANO NETTO _____
ASSINATURA _____ /_ /_
LOCAL, DATA

11.3 Aprovação do Comitê de Ética.



Curitiba, 27 de agosto de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
Diogo Cristiano Netto
Nesta

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Resposta leucocitária e parâmetros bioquímicos sanguíneos de jogadores de futebol. Análise da fase preparatória à fase de competição”**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 27 de agosto de 2008.

Registro CEP/SD: 613.150.08.08 CAAE: 0056.0.091.091-08

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 27/02/2009.

Atenciosamente

Profa. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Prof. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - CEEPP/UFPR

ENTREGUE
29/09/08

Diogo C Netto