

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E  
TECNOLOGIAS**

---

**RELAÇÃO ENTRE ECONOMIA DE CORRIDA E FORÇA MUSCULAR: ANÁLISE  
PELO MODELO DE DANO MUSCULAR INDUZIDO PELA CORRIDA EM  
DECLIVE**

**LEONARDO COELHO RABELLO DE LIMA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento Humano e Tecnologias.

**Agosto - 2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE RIO CLARO**

**Relação entre economia de corrida e força muscular: Análise pelo modelo de dano muscular induzido pela corrida em declive**

**Leonardo Coelho Rabello de Lima  
Orientador: Prof. Dr. Benedito Sérgio Denadai**

**RIO CLARO  
Agosto - 2017**

574.1 Lima, Leonardo Coelho Rabello  
L732r Relação entre economia de corrida e força muscular :  
análise pelo modelo de dano muscular induzido pela corrida  
em declive / Leonardo Coelho Rabello Lima. - Rio Claro,  
2017  
126 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Benedito Sérgio Denadai

1. Fisiologia. 2. Fisiologia do exercício. 3. Contrações  
excêntricas. 4. Rabdomiólise. 5. Eficiência de corrida. 6.  
Neuromuscular. 7. Profilaxia. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

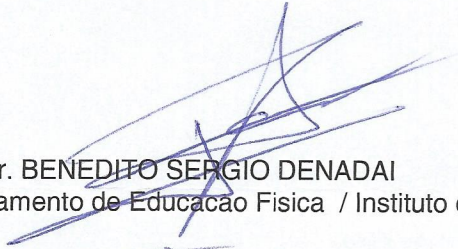
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Relação entre economia de corrida e força muscular: análise pelo modelo de dano muscular induzido pela corrida em declive


**AUTOR: LEONARDO COELHO RABELLO DE LIMA**

**ORIENTADOR: BENEDITO SERGIO DENADAI**

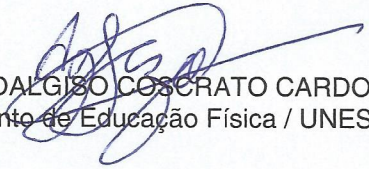
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em DESENVOLVIMENTO HUMANO E TECNOLOGIAS, área: TECNOLOGIAS NAS DINÂMICAS CORPORAIS pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. BENEDITO SERGIO DENADAI  
Departamento de Educação Física / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

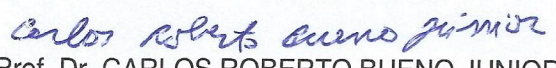


Prof. Dr. TIAGO REZENDE FIGUEIRA  
Faculdade de Ciências Médicas / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - SP



Prof. Dr. ADALGISO COSCRATO CARDOZO  
Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. RONEI SILVEIRA PINTO  
Escola de Educação Física / Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS



Prof. Dr. CARLOS ROBERTO BUENO JUNIOR  
Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo /USP - SP

Rio Claro, 07 de agosto de 2017

À minha esposa e melhor amiga Sissy,  
minha eterna companheira e fonte de inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas e instituições envolvidas na elaboração dessa tese e na minha formação pessoal e acadêmica. Nesta sessão, expresso meus agradecimentos àqueles sem os quais nada disso seria possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Pela confiança na minha capacidade de conduzir esse projeto e pelos fomentos em formato de Bolsa de Doutorado no País (Processo 2013/23585-4) e Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (Processo 2016/04909-1).

Aos voluntários que participaram deste estudo. As contribuições feitas por vocês para a ciência do exercício/esporte são anônimas e raramente reconhecidas, mas não nesse caso. Vi, medi e acompanhei a dor e o esforço de cada um de vocês ao longo de duas longas semanas e não posso ser mais grato por isso. Estudar o dano muscular é uma boa maneira de medir o quão fiéis são seus amigos, que se submetem a todos os tipos de procedimentos invasivos, dolorosos e fatigantes para colaborar com a sua formação. Muito obrigado, vocês nunca serão esquecidos.

Aos meus professores. Todos, desde o ensino fundamental até o doutorado. Por terem despertado em mim – mesmo que tardiamente, talvez – o entusiasmo por estudar e conhecer novos assuntos. Em especial, a alguns professores do Departamento de Educação Física da UNESP Rio Claro, que acompanharam a minha formação e seguiram me orientando nessa ainda curta trajetória acadêmica. Levo seus ensinamentos comigo e espero um dia inspirar meus futuros alunos da mesma maneira que vocês me inspiraram.

Ao meu orientador, Benedito Sérgio Denadai. A possibilidade de ser orientado por um pesquisador de tamanha expressão na área da Educação Física no Brasil é um privilégio para poucos e sou muito grato por isso. Agradeço pela abertura, sinceridade e pelas oportunidades abertas durante todo esse processo e concluo esta tese com a certeza de que a minha evolução acadêmica nos últimos dez anos ocorreu, em grande parte, devido às inúmeras conversas e discussões que tivemos desde o trabalho de conclusão de curso até hoje. Espero e almejo um dia atingir uma posição em que os meus pares me respeitem tanto quanto os seus te respeitam, assim como espero também ter contribuído de alguma maneira para a sua carreira acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório. Todos aqueles que compartilharam seus conhecimentos comigo desde a iniciação científica até a submissão dessa tese: André Souza, Rogério Corvino, Dalton Müller, Sérgio Camarda, Renata Tardivo, Felipe Oliveira, Thiago Oliveira, Fabiano Barbosa, Renato Caritá, Claudio Assumpção, Natália Bassan, Eduardo Ozaki, Pedro Guizelini, Leonardo Abdalla, Renan Barreto e César Silveira. Aprendi e dei muitas risadas com vocês e espero ter contribuído, também, com as suas formações. Fico feliz ao ler essa lista e perceber que ainda tenho a grande maioria de vocês como amigos, mesmo com a distância geográfica imposta por essa carreira acadêmica que tanto nos afasta.

Aos meus amigos e amigas da pós-graduação. O contato com vocês sempre foi tanto uma válvula de escape para os problemas relacionados ao doutorado quanto uma oportunidade de aprender a partir de visões diferentes. Devo muito do meu (pouco) conhecimento sobre estatística, método científico, estrutura acadêmica e cerveja a vocês. Em especial, agradeço aos amigos Inaian Teixeira e ao Luiz Gustavo Rufino pela amizade e longas discussões sobre os mais diversos assuntos – acadêmicos ou não.

Às equipes de Handebol masculino e feminino de Rio Claro. Por anos a minha principal atividade extracurricular e paixão esportiva. Às vezes servindo com válvula de escape e muitas outras como fonte de estresse, preocupação e, acima de tudo, prazer. Obrigado por fazerem parte da minha identidade e formação profissional. Carrego vocês comigo para sempre tanto na pele quanto no coração. Agradeço, em especial, aos meus amigos e colegas de trabalho de comissão técnica César Picardt e Guilherme Goulardins.

À Edith Cowan University (ECU), Austrália, por ter me acolhido durante o meu estágio de pesquisa no exterior. Joondalup se tornou uma segunda casa para mim e um local para onde espero retornar no futuro. Aos amigos Ronei Pinto, Matheus Pinto, Trevor Chen, Kazuhiro Ishimura, Haru Kato, Kayoko Ando, Georgios Mavropalias, Benjamin Khan e Marcin Lipski pela quantidade impressionante de informações (acadêmicas ou não) que eu tive a oportunidade de absorver em um período tão curto aos seus lados na Austrália. Em especial, ao meu supervisor durante o estágio de pesquisa no exterior, Ken Nosaka. Agradeço pelos direcionamentos, contribuições e gentileza durante a minha visita à ECU. Foram dois meses de muito crescimento e aprendizado sob sua supervisão e espero poder continuar contando com suas colaborações ao longo da minha carreira acadêmica.

Às técnicas de laboratório da UNESP Rio Claro e EEFERP – USP, sem a ajuda das quais essa tese não chegaria à fase de impressão: Renata Tardivo, Clarice Sibuya e Simone Tavares. Agradeço pelos ensinamentos e, principalmente, pela paciência e compreensão das minhas limitações. Além de tornar as minhas análises possíveis, vocês sempre as tornaram agradáveis e até divertidas. Em especial, agradeço à Rê pela parceria dentro e fora do laboratório. Sei que não é fácil atuar como técnica de laboratório, psicóloga e conselheira. E agradeço, principalmente pela sua amizade nesse processo.

Aos professores que colaboraram diretamente com esse projeto desde sua concepção até o seu término: Camila Greco, Adalgiso Cardozo, Tiago Figueira, Jonato Prestes, Carlos Bueno Junior, Ronei Pinto e Ken Nosaka. Suas contribuições foram – e têm sido – muito importantes para a concepção, execução e discussão desta tese e a oportunidade de trabalhar com profissionais tão competentes e reconhecidos nos seus meios é um privilégio. Espero poder fazer jus aos seus ensinamentos ao longo da minha carreira acadêmica.

Aos alunos que co-orientei durante minha passagem pelo Laboratório de Avaliação da Performance Humana: Akothirene Marques, Lívia Delgado, Júlia Leopardi, Pedro Guizelini, Levy Dias, Felipe Cândia, Samuel Ferreira e Renan Barreto. Orientá-los me ajudou muito a crescer enquanto pessoa e pesquisador.

Aos amigos de Rio Claro. Por todo o tempo despendido no *whatsapp* falando sobre tudo e nada ao mesmo tempo. Pela participação neste projeto enquanto voluntários, pelo melhor time de basquete que a UNESP Rio Claro já viu jogar, pelos inúmeros apelidos e pela amizade de sempre.

Aos meus amigos de Campinas, Fernando Valente, Guilherme Sampaio, Lyan Porto, Paula Magalhães e Vitor Ramos, que torceram por mim e me apoiaram durante todo esse processo e toda a vida. Dificilmente acharei outras pessoas com tantas afinidades em comum ao longo da vida. Obrigado pelos bons momentos.

À minha família imediata, Roberto, Marta e Henrique Lima, por fornecer todo o suporte afetivo, estrutural e financeiro durante toda a minha vida. Foram vocês que estimularam em mim o pensamento crítico e a paixão pela ciência. À minha avó Anna, tia Anita (*in memoriam*) e tia Sônia (Di) por também terem estado presentes em todos os momentos importantes da minha vida, sempre torcendo e fazendo de tudo para que as coisas se encaminhassem. Sou muito grato por ter



tido o privilégio nascer e ser criado por uma família como essa. Ao meu grande amigo que só não compartilha os genes, mas é como um irmão para mim; Gustavo Grisolia. Foram incontáveis os bons momentos compartilhados com você nos últimos vinte anos.

À pessoa a quem dedico esta tese; minha esposa Sissy Bianca Oishi de Lima. Por ser, ao mesmo tempo, meu apoio, inspiração, referência e refúgio. Por ter compartilhado comigo todos os tipos de experiências; da tristeza à felicidade, da loucura à paz, do fracasso ao sucesso, das rejeições aos aceites. Você nem imagina a importância que você teve para esse processo. Sou eternamente grato pelos seus esforços em compreender a instabilidade da carreira acadêmica e por me apoiar e estar sempre ao meu lado, mesmo que, às vezes, tendo que postergar alguns de seus planos. Você é o meu amor, minha paz e o meu orgulho. Espero poder continuar compartilhando bons e maus momentos com você e estou mais do que disposto a te apoiar em todos os momentos da sua vida, também.

Encerro esta sessão convidando o leitor a virar a página e ler a epígrafe desta tese. Embora possa ser considerada um *cliché* para o meio acadêmico, essa citação reflete muito bem tudo o que foi expresso nesta sessão e o meu entendimento da minha evolução e do processo científico-acadêmico. Obrigado a todos. Vocês são meus gigantes.

“Se consegui ver mais longe, foi por  
estar sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

## RESUMO

**Introdução:** Alguns estudos longitudinais têm mostrado que a força pode influenciar a economia de corrida (EC). Entretanto, outros modelos [p.ex., dano muscular (DM) induzido por corridas em declive (CrED)] mostram que a magnitude e a cinética de recuperação da EC e da força máxima medida em exercícios de cadeia cinética aberta [pico de torque isométrico de extensão do joelho (PTI)] podem ser diferentes. Fatores como o tipo de exercício usado para medir a força e a forma pela qual a força se manifesta (máxima e explosiva), podem explicar, pelo menos em parte, estes dados antagônicos. O objetivo geral deste estudo foi utilizar o modelo de DM induzido pela CrED para analisar a relação entre força máxima e explosiva e a EC. **Método:** Para isso, foram empregadas três intervenções para modular o DM induzido pela CrED e verificar seus efeitos sobre a força e a EC. Participaram do estudo 85 sujeitos ativos ( $22,3 \pm 2,4$  anos,  $78 \pm 9,4$  kg,  $176,9 \pm 5$  cm) que foram aleatoriamente separados em grupo controle (CON), placebo (PLA), suplementação (SUP), isométrico (ISO) e combinado (COMB). CON foi dividido em indivíduos com presença e ausência da  $\alpha$ -actinina-3, resultante de polimorfismo do gene ACTN3. Todos os grupos realizaram uma CrED (-15%) por 30 min a 70%  $VO_2$ max. SUP ingeriu um suplemento rico em compostos flavonoides antes e após a CrED, PLA ingeriu um placebo nos mesmos períodos, ISO realizou 10 contrações isométricas máximas (CIM) dois dias antes da CrED e COMB ingeriu o suplemento e realizou 10 CIM antes da CrED. Foram avaliados marcadores indiretos de DM (força, dor, amplitude de movimento e circunferência da coxa, e atividade sérica de CK) e EC antes e imediatamente, 24, 48, 72 e 96 horas após a CrED. Alterações ao longo do tempo e entre grupos foram analisadas por meio de ANOVA de dois caminhos com *post-hoc* de Bonferroni. **Resultados:** Os resultados obtidos demonstraram comprometimento significativo da EC após a CrED, assim como alterações significantes em marcadores de DM. Foi identificado um efeito de aceleração da recuperação nas alterações no DM e EC para os grupos SUP e COMB (que apresentaram retorno do  $VO_2$  e PTI a níveis basais no dia seguinte e dois dias após a CrED, respectivamente) em relação ao grupo CON. Os grupos que consumiram o suco antioxidante também apresentaram atenuação significativa da dor muscular após a CrED. Entretanto, a diferença de cinética de recuperação entre força e EC se manteve mesmo frente aos tratamentos. O grupo ISO apresentou aceleração da recuperação do PTI, mas não da EC, assim como atenuação da dor muscular em relação ao grupo CON. Alterações na altura de saltos foram significantes, sendo que os valores retornaram a níveis basais antes dos valores de PTI. Em relação aos polimorfismos do gene ACTN3, não houve influência do genótipo nas alterações na EC. Entretanto, como esperado, houve maior perda de força para indivíduos RR (que sintetizam a  $\alpha$ -actinina-3). **Conclusão:** Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que há, sim, uma relação entre aspectos neuromusculares e a EC. Entretanto, outros fatores, que não a capacidade de produção de força isoladamente, parecem contribuir para essa relação. Ademais, as estratégias de atenuação do DM investigadas no presente estudo parecem ser eficazes na aceleração da recuperação da EC e da força muscular e o polimorfismo do gene ACTN3 parece ser um dos fatores que explicam a susceptibilidade ao DM.

**Palavras-chave:** Força muscular; Economia de corrida; Dano muscular; Profilaxia; ACTN3.

## ABSTRACT

**Introduction:** Longitudinal studies have been showing that strength production capacity might influence running economy (RE). However, other study models [e.g., downhill running (DhR) induced muscle damage (MD)] show different magnitudes of change and recovery kinetics between strength measured with open kinetic chain exercises [knee extension isometric peak torque (IPT)] and RE might differ. Factors such as the type of exercised used to measure strength and its form of manifestation (maximal or explosive) might, at least in part, explain these differences. The aim of the present study was to analyze the association between strength production capacity and RE using an DhR induced MD model. **Methods:** To do so, three different prophylactic strategies were adopted to modulate MD induced by DhR and also analyze their effects on strength production capacity and RE. Eighty five active subjects ( $22.3 \pm 2.4$  years,  $78 \pm 9.4$  kg,  $176.9 \pm 5$  cm) participated in the study and were randomly allocated to control (CON), placebo (PLA), supplementation (SUP), isometric (ISO), and combined (COMB) groups. Participants in CON were separated based on their ACTN3 polymorphisms. All groups ran downhill (-15%) for 30 min at 70%  $VO_2$ max. SUP ingested a flavonoid-rich supplement before and following DhR, PLA ingested an isocaloric placebo at the same time points, ISO performed 10 maximal isometric contractions (MIC) two days prior to the DhR, and COMB ingested the supplement and performed the MIC before DhR. MD symptoms (strength, soreness, knee joint range of motion, thigh circumference, and serum CK activity) and RE were assessed before, immediately after, and 1-4 days following DhR. Changes over time and between groups were analyzed with two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* tests. **Results:** Results showed that RE was significantly compromised following DhR and MD markers were also affected. Faster recovery of RE and MD markers was identified for the SUP and COMB groups (which reached full recovery of  $VO_2$  and IPT 1 and 3 days following the DhR, respectively), as compared to CON. Both groups that consumed the antioxidant supplement also presented significant attenuation of muscle soreness following DhR. However, the difference in the recovery kinetics of strength and RE was maintained with this treatment. ISO presented faster recovery of IPT, but not RE, and attenuation and faster recovery of soreness, as compared to CON. Significant changes in jump height were found for all groups, with faster recovery when compared to IPT. No influence of the ACTN3 gene polymorphism was found for changes in RE. However, as expected, RR individuals presented significantly greater strength loss following DhR. **Conclusion:** When put together, our results suggest that there is, indeed, an association between neuromuscular aspects and RE. However, factors other than strength production *per se* seem to contribute to this association. Moreover, the prevention/recovery strategies investigated in the present study seem to be effective to promote faster recovery of RE and strength following DhR. Also, ACTN3 gene polymorphism seems to be one of the factors contributing to susceptibility to MD, but not changes in RE.

**Key-words:** Strength; Running economy; Exercise-induced muscle damage; Prophylaxis; ACTN3.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Disposição da esteira para a corrida em declive. ....	<b>57</b>
<b>Figura 2.</b> Delineamento experimental do estudo de suplementação .....	<b>59</b>
<b>Figura 3.</b> Disposição do aparelho de <i>Leg Press</i> durante a realização das contrações isométricas máximas para os grupos ISO e COMB. ....	<b>60</b>
<b>Figura 4.</b> Delineamento experimental do estudo de contrações isométricas máximas. ....	<b>60</b>
<b>Figura 5.</b> Protocolo do teste incremental de rampa, utilizado para a determinação do consumo máximo de oxigênio .....	<b>63</b>
<b>Figura 6.</b> Gráfico representando a estabilização dos marcadores respiratórios de EC ao longo dos cinco minutos de corrida.....	<b>65</b>
<b>Figura 7.</b> Posicionamento dos voluntários durante a execução das contrações isométricas máximas no dinamômetro isocinético. ....	<b>67</b>
<b>Figura 8.</b> Ilustração de uma curva de taxa de desenvolvimento de torque (TDT) em função do tempo com sinalização do valor utilizado para análise. ....	<b>67</b>
<b>Figura 9.</b> Teste de step para a determinação da percepção subjetiva de dor .....	<b>68</b>
<b>Figura 10.</b> Execução do salto com contra movimento. ....	<b>70</b>
<b>Figura 11.</b> Execução do <i>squat jump</i> . ....	<b>71</b>
<b>Figura 12.</b> Alterações em variáveis metabólicas de economia de corrida ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive. ....	<b>77</b>
<b>Figura 13.</b> Alterações em variáveis perceptuais e biomecânicas de economia de corrida ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive. ....	<b>78</b>
<b>Figura 14.</b> Alterações em marcadores de dano muscular ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive. ....	<b>79</b>
<b>Figura 15.</b> Alterações no pico de torque isométrico (a) e taxa de desenvolvimento de torque (b) ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive.....	<b>81</b>
<b>Figura 16.</b> Valores de força máxima de reação do solo e altura de salto durante saltos com contra movimento (a, b) e <i>squat jumps</i> (c, d) ao longo do tempo (dias). ....	<b>82</b>
<b>Figura 17.</b> Alterações em variáveis metabólicas de economia de corrida ao longo do tempo (dias) entre os polimorfismos do gene ACTN3 induzidas pela corrida em declive. ....	<b>84</b>

<b>Figura 18.</b> Alterações em variáveis perceptuais e biomecânicas de economia de corrida entre os polimorfismos do gene ACTN3 ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive.....	<b>85</b>
<b>Figura 19.</b> Alterações em marcadores de dano muscular ao longo do tempo (dias) e entre os polimorfismos do gene ACTN3 induzidas pela corrida em declive. ....	<b>86</b>
<b>Figura 20.</b> Alterações no pico de torque isométrico (a) e taxa de desenvolvimento de torque (b) ao longo do tempo (dias) e entre os polimorfismos do gene ACTN3 induzidas pela corrida em declive.....	<b>87</b>
<b>Figura 21.</b> Valores de força máxima de reação do solo e altura de salto durante saltos com contra movimento (a, b) e <i>squat jumps</i> (c, d) ao longo do tempo (dias) e entre os polimorfismos do gene ACTN3 induzidas pela corrida em declive.....	<b>87</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores (médias $\pm$ DO) das características dos voluntários e dos dados obtidos durante o teste incremental para os grupos controle (CON), placebo (PLA), suplementação (SUP), isométrico (ISO) e combinado (COMB). .....	<b>74</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores (médias $\pm$ DP) de marcadores de economia de corrida obtidos antes da corrida em declive. ....	<b>76</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores (médias $\pm$ DP) de marcadores de dano muscular obtidos antes da corrida em declive. ....	<b>76</b>
<b>Tabela 4.</b> Valores (médias $\pm$ DP) de variáveis relacionadas ao torque obtidos antes da corrida em declive. ....	<b>80</b>
<b>Tabela 5.</b> Valores (médias $\pm$ DP) de variáveis obtidas a partir de saltos com contra movimento e <i>squat jumps</i> antes da corrida em declive. ....	<b>80</b>
<b>Tabela 6.</b> Valores (médias $\pm$ DP) de marcadores de economia de corrida obtidos antes da corrida em declive. ....	<b>83</b>
<b>Tabela 7.</b> Valores (médias $\pm$ DP) de marcadores de dano muscular obtidos antes da corrida em declive para os indivíduos com os diferentes polimorfismos do gene ACTN3. ....	<b>84</b>
<b>Tabela 8.</b> Valores (médias $\pm$ DP) de variáveis relacionadas ao torque obtidos antes da corrida em declive para os indivíduos com os diferentes polimorfismos do gene ACTN3. ....	<b>85</b>
<b>Tabela 9.</b> Valores (médias $\pm$ DP) de variáveis obtidas a partir de saltos com contra movimento e <i>squat jumps</i> antes da corrida em declive para os indivíduos com os diferentes polimorfismos do gene ACTN3. ....	<b>86</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANN** – Antocianinas

**ANOVA** – Análise de variância

**CIM** – Contrações isométricas máximas

**CK** – Creatina quinase

**COMB** – Grupo de contrações isométricas máximas e suplementação

**CON** – Grupo controle

**CrED** – Corrida em declive

**CRP** – Proteína C-reativa

**DM** – Dano muscular induzido pelo exercício

**DOMS** – Dor muscular de início tardio

**EC** – Economia de corrida

**ECR** – Efeito da carga repetida

**ERO** – Espécies reativas de oxigênio

**F<sub>r</sub>** – Pico de força de reação do solo

**GRR** – Grupo de indivíduos com o polimorfismo R577RR do gene ACTN3

**GRX** – Grupo de indivíduos com o polimorfismo R577RX do gene ACTN3

**GXX** – Grupo de indivíduos com o polimorfismo R577XX do gene ACTN3

**IL-4, -5, -6, -10, -13 e -1 $\beta$**  – Interleucinas -4, -5, -6, -10, -13 e -1 $\beta$ , respectivamente

**ISO** – Grupo de contrações isométricas máximas

**PLA** – Grupo placebo

**PSD** – Percepção subjetiva de dor

**PSE** – Percepção subjetiva de esforço

**PTI** – Pico de torque isométrico

**QR** – Coeficiente de trocas respiratórias



**R577RR** – Indivíduos homozigotos para o alelo R do polimorfismo R577 do gene ACTN3

**R577RX** – Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo R577 do gene ACTN3

**R577XX** – Indivíduos homozigotos para o alelo X do polimorfismo R577 do gene ACTN3

**SA** – Suco antioxidante

**SUP** – Grupo de suplementação

**TDF<sub>r</sub>** – Taxa de desenvolvimento da força de reação do solo

**TDT** – Taxa de desenvolvimento de torque

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral-alfa

**VE** – Ventilação

**VCO<sub>2</sub>** – Volume de dióxido de carbono

**VO<sub>2</sub>** – Volume de oxigênio

**VO<sub>2max</sub>** – Consumo máximo de oxigênio

**[La]** – Concentração sanguínea de lactato

## LISTA DE EQUAÇÕES

(1) Amplitude de passada.....	64
(2) Altura de salto.....	72

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	23
2.1 Economia de corrida.....	23
2.1.1 Economia de corrida, metabolismo e antropometria.....	23
2.1.2 Economia de corrida, músculo esquelético e biomecânica .....	24
2.2 Dano muscular induzido pelo exercício .....	28
2.2.1 Fase primária do dano muscular.....	28
2.2.2 Fase secundária do dano muscular .....	30
2.2.3 Efeito da carga repetida.....	31
2.3 Contrações isométricas máximas como estratégia de proteção contra o dano muscular induzido pelo exercício .....	33
2.3.1 Possíveis mecanismos fisiológicos.....	35
2.4 Antocianinas.....	37
2.4.1 Antocianinas e marcadores de estresse oxidativo e inflamação .....	37
2.4.2 Antocianinas e o dano muscular induzido pelo exercício .....	39
2.5 Polimorfismo do gene ACTN3 e as $\alpha$ -actininas.....	43
2.5.1 ACTN3 e desempenho .....	45
2.5.2 ACTN3 e o dano muscular induzido pelo exercício .....	47
3 JUSTIFICATIVA.....	53
4 OBJETIVO.....	54
4.1 Objetivo geral.....	54
4.2 Objetivos específicos.....	54
5 HIPÓTESES.....	55
6 MATERIAL E MÉTODOS .....	56
6.1 Voluntários.....	56
6.2 Delineamento experimental.....	56
6.2.1 Especificidade da avaliação de força.....	57
6.2.2 Suplementação .....	58
6.2.3 Contrações isométricas.....	59

6.2.4 Suplementação com suco antioxidante e realização de contrações isométricas máximas .....	60
6.2.5 Polimorfismo do gene ACTN3.....	61
6.3 Genotipagem do polimorfismo R577 do gene ACTN3.....	61
6.4 Determinação do VO <sub>2</sub> max da intensidade em que ele é atingido .....	62
6.5 Economia de corrida.....	63
6.6 Marcadores indiretos de dano muscular .....	65
6.6.1 Pico de torque isométrico e taxa de desenvolvimento de torque.....	65
6.6.2 Percepção subjetiva de dor .....	68
6.6.3 Atividade sérica da enzima creatina quinase.....	69
6.6.4 Amplitude de movimento ativo do joelho.....	69
6.6.5 Circunferência da porção medial da coxa .....	69
6.6.6 Saltos com contra movimento e <i>squat jumps</i> .....	70
7 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	73
8 RESULTADOS.....	74
<b>8.1 Economia de corrida .....</b>	<b>75</b>
8.2 Dano muscular .....	75
8.3 Força muscular .....	79
8.4 Polimorfismo do gene ACTN3 .....	82
9 DISCUSSÃO.....	88
9.1 Economia de corrida.....	88
9.2 Dano muscular .....	91
9.3 Força muscular .....	93
9.4 Polimorfismo do gene ACTN3 .....	95
9.5 Economia de corrida vs força muscular .....	99
10 CONCLUSÃO .....	103
REFERÊNCIAS .....	104
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO I.....	116
Assinatura do Voluntário .....	117
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO II.....	118
Assinatura do Voluntário .....	119
APÊNDICE C – ESCALA DE ANÁLOGOS VISUAIS.....	120
APÊNDICE D – DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE.....	121

ANEXO A – TESTES LABORATORIAIS DO SUCO ANTIOXIDANTE .....	122
---	-----

## 1 INTRODUÇÃO

A economia de corrida (EC) pode ser considerada como um dos mais importantes marcadores da aptidão aeróbia relacionada à corrida. Pode-se defini-la como o custo energético para o sustento da atividade de corrida em uma intensidade submáxima (SAUNDERS et al., 2004). A importância da EC reside no fato da mesma expressar a eficiência de atletas e praticantes de atividade física durante corridas. Sabe-se, por exemplo, que atletas com valores similares de consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) podem apresentar diferentes desempenhos em provas de longa duração devido a diferenças na EC (COYLE et al., 1988; HOOBKAMER et al., 2016).

Há diversos fatores que podem influenciar aguda e cronicamente a EC, sendo que uma parcela considerável dos estudos sobre a mesma investiga a relação desta com a força muscular, em suas diversas manifestações (SAUNDERS et al., 2006; STØREN et al., 2008). Há evidências de que a adição de rotinas de treinamento de força e potência ao treinamento específico de corrida promove uma melhora em índices de EC em atletas (MILLET et al., 2002; TURNER et al., 2003; SAUNDERS et al., 2006; STØREN et al., 2008; DENADAI et al., 2017)

Levando em conta a existência de uma relação entre força (e outros aspectos neuromusculares) e a EC, há um crescente número de estudos investigando alterações na EC induzidas pelo dano muscular (DM) (CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2009; BRAUN & PAULSON, 2012). Esses estudos têm demonstrando um efeito de diminuição da EC (i.e., aumento do consumo de oxigênio) após o DM, que pode ser definido como o processo de desorganização e perda de função do sistema neuromuscular e frequentemente é induzido por exercícios aos quais não se está habituado, principalmente quando esses possuem caráter excêntrico (CLARKSON & HUBAL, 2002). Os principais sintomas resultantes do DM são a diminuição da capacidade de produção de força, extravasamento de proteínas e enzimas intracelulares como a creatina quinase (CK) para a circulação sanguínea, dor muscular de início tardio, diminuição da amplitude de movimento e edema (TRICOLI, 2001; CLARKSON & HUBAL, 2002).

Tradicionalmente, estudos que investigam o DM utilizam contrações excêntricas máximas como forma de indução desse fenômeno (CHEN et al., 2011a; LIMA & DENADAI, 2011). Entretanto, nas últimas décadas, alguns autores têm adotado a corrida em declive (CrED) como

método de indução de DM, uma vez que, durante essa atividade, grandes volumes de contrações excêntricas submáximas são realizados com um aumento simultâneo do estresse oxidativo (BRAUN & DUTTO, 2003; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2009). Estudos recentes têm apontado para a diminuição da EC após CrED, assim como após outras atividades danificadoras (p. ex. saltos). Entretanto, as alterações encontradas na força muscular são diferentes daquelas encontradas na EC tanto no que diz respeito à magnitude das mudanças percentuais quanto na cinética de recuperação (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

Nos últimos anos, têm sido publicados estudos que demonstram que alguns tipos de intervenção podem levar à proteção contra o DM. Entre essas intervenções estão a suplementação com compostos antioxidantes e/ou anti-inflamatórios (KUEHL, 2012) e a realização de contrações isométricas máximas (CHEN et al., 2012a; CHEN et al., 2012b; CHEN et al., 2013) anteriormente a sessões danificadoras. Essas estratégias vêm sendo abundantemente investigadas e têm demonstrado sucesso na prevenção contra o DM. A proteção contra o DM conferida pela suplementação com alimentos ricos em antocianinas (ANN) ocorre devido à ação anti-inflamatória e antioxidante desse composto fitoquímico; um composto flavonoide presente na forma de pigmentos em frutas de coloração escura que sequestra espécies reativas de oxigênio e sinaliza para a inibição de mediadores inflamatórios (CONNOLLY, et al., 2006; HOWATSON et al., 2010; KHUEL et al., 2010; BOWTELL et al., 2011). Já a proteção contra o DM conferida por contrações isométricas máximas parece estar relacionada, também, a uma proteção contra espécies reativas de oxigênio, além de alterações na expressão de proteínas de choque térmico e fortalecimento da matriz extracelular (CHEN et al., 2012a; CHEN et al., 2013). Não há estudos de nosso conhecimento que investiguem os efeitos da aplicação (simultânea ou não) das duas estratégias acima em marcadores de DM e EC, após corrida em declive.

Além de diferentes estratégias de intervenção, outros fatores podem influenciar a susceptibilidade ao DM como, por exemplo, a temperatura da musculatura durante a atividade danificadora (NOSAKA et al., 2007), o nível de aptidão física (GLEESON et al., 2003) e polimorfismos genéticos (PIMENTA et al., 2011). Sabe-se que o polimorfismo R577X do gene ACTN3, responsável pela codificação da proteína estrutural  $\alpha$ -actinina-3, leva à formação de uma forma truncada dessa proteína - a  $\alpha$ -actinina-2 -, que fornece menos estabilidade estrutural aos sarcômeros - o que, hipoteticamente, tornaria os indivíduos mais suscetíveis ao DM (SETO et al., 2011). Entretanto, devido a essa suposta susceptibilidade inata ao DM, indivíduos com esse

polimorfismo parecem se beneficiar de um efeito protetor fenotípico, conferido pelo DM sofrido ao longo da vida. Ou seja, indivíduos com o polimorfismo R577X do gene ACTN3 parecem sofrer menor magnitude de DM quando comparados aos indivíduos do genótipo RR do gene ACTN3 (que sintetizam a  $\alpha$ -actinina-3) (VENCKUNAS et al., 2012). Ao mesmo tempo, há evidências de que a ausência da  $\alpha$ -actinina-3 resulta em melhores desempenhos em provas de endurance (YANG et al., 2003; EYNON et al., 2009), o que pode ser justificado pelo fato de indivíduos que não expressam essa proteína apresentarem maiores concentrações de enzimas mitocondriais e menor atividade da enzima glicogênio fosforilase, favorecendo o metabolismo oxidativo durante o exercício (MacARTHUR et al., 2007; QUINLAN et al., 2010). Parece haver, também, uma relação entre o polimorfismo do gene ACTN3 e os níveis basais de EC de indivíduos não treinados. Pasqua et al. (2015) demonstraram que indivíduos heterozigotos apresentam menor custo de locomoção durante a corrida do que indivíduos homozigotos para ambos os alelos R e X.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Economia de corrida

Quando se visa analisar o desempenho de corrida, muitas variáveis são levadas em consideração. Por se tratar de uma atividade cíclica complexa que envolve a totalidade do corpo, a corrida pode ser influenciada não apenas por fatores metabólicos, mas também biomecânicos (NUMMELA et al., 2007). Esses fatores biomecânicos podem variar do aproveitamento da energia elástica do músculo esquelético durante as contrações musculares (ARAMPATZIS et al., 2011) até o tipo de calçado utilizado durante a corrida (PERL et al., 2012) ou o tipo de terreno em que ela é realizada (PINNINGTON & DAWSON, 2001). Uma variável determinante para o desempenho, e que é sensivelmente influenciada por esses fatores, é a EC. A EC pode ser definida como o volume de oxigênio (normalmente medido em mililitros de oxigênio divididos pelo tempo e normalizados pela massa corporal) necessário para sustentar a corrida em uma velocidade submáxima constante (SAUNDERS et al., 2004; LACOUR & BOURDIN, 2015). Neste tópico, pretendemos revisar alguns fatores metabólicos e, principalmente, biomecânicos que podem influenciar a EC.

#### 2.1.1 Economia de corrida, metabolismo e antropometria

Por uma questão de especificidade, o primeiro fator ao qual se associa a EC é o metabólico. Há, de fato, uma relação entre variáveis como o coeficiente de trocas gasosas (QR) (SHAW et al., 2013), o  $VO_2\text{max}$  (FLETCHER et al., 2009), a ventilação (THOMAS et al., 1999) e a EC. Diversos estudos identificaram correlação positiva entre os valores de  $VO_2\text{max}$  e EC (LACOUR et al., 1990; PADILLA et al., 1992; PATE et al., 1992; FLETCHER et al., 2009). Entretanto, embora positivamente correlacionados, sabe-se que atletas com o mesmo valor de  $VO_2\text{max}$  podem realizar provas com desempenhos diferentes, majoritariamente em função de diferentes níveis de EC (COYLE et al., 1988). Denadai (1996) revisou a literatura disponível na época sobre fatores fisiológicos que influenciam a EC e identificou diversos fatores, relacionados ou não ao exercício, que afetam a EC, como a maturação, sexo, frequência cardíaca e o estado de treinamento.

Algumas variáveis antropométricas também podem afetar a EC. A massa corporal, por exemplo, é negativamente correlacionada com o custo energético de corrida (PATE et al., 1992). A estatura também parece apresentar a mesma relação com a EC. Entretanto, Bourdin et al. (1995) demonstraram que essa similaridade da relação entre a massa corporal e a estatura com a EC se dá por aquelas apresentarem correlação positiva entre si. Uma estratégia para anular a influência da massa corporal nos valores de EC que tem sido empregada na maior parte dos estudos, é a normalização dos valores de consumo de oxigênio pela massa corporal ( $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  para a EC e  $\text{ml.kg}^{-1}.\text{km}^{-1}$  para o custo energético) (SHAW et al., 2014). Embora tenha sido demonstrada correlação significativa entre a estatura e a EC (justificada, provavelmente, pela relação dessa com a massa corporal), o mesmo não ocorre com o comprimento dos membros inferiores. Diversos estudos demonstraram que essa variável antropométrica não é significativamente correlacionada com a EC e nem com o comprimento ótimo de passada durante a corrida (CAVANAGH & WILLIAMS, 1982; MORGAN et al., 1994; DALLEAU et al., 1998).

### 2.1.2 Economia de corrida, músculo esquelético e biomecânica

Embora a EC seja considerada um dos principais índices de avaliação do desempenho aeróbio (LACOUR & BOURDIN, 2015), parte considerável dos estudos sobre o assunto avaliam a sua relação com variáveis biomecânicas e, principalmente, de força muscular (TURNER et al., 2003; SAUNDERS et al., 2006; MOJOCK et al., 2011; TARTARUGA et al., 2012; ASSUMPCÃO et al., 2013). Para tanto, diversos modelos de estudo têm sido empregados, desde intervenções com treinamento resistido (STØREN et al., 2008) a exercícios intensos danificadores (CHEN et al., 2007) e de alongamento agudo (MOJOCK et al., 2011), com o intuito de manipular a força, nas suas diversas manifestações, e analisar a sua relação com a EC.

Há mais de uma teoria que associa a força muscular à EC. Uma dessas teorias leva em conta que um músculo com níveis de rigidez passiva que permitam um bom aproveitamento do coeficiente elástico do músculo, apresentaria, também, um bom aproveitamento do ciclo alongamento-encurtamento durante as passadas na corrida. A otimização desse ciclo preveniria a dissipação de energia e utilizaria as propriedades elásticas do músculo esquelético com maior eficiência, diminuindo, assim, o gasto energético decorrente de contrações concêntricas (CAVAGNA et al., 1964; ARAMPATZIS et al., 2011). Esse modelo foi inicialmente proposto

por Cavagna et al. (1964), como o “modelo da bola pingando” (*bouncing ball model*, em inglês), em que se considera que a eficiência do movimento de um corpo está relacionada à sua massa e ao seu coeficiente elástico (no caso, a rigidez passiva, ou *stiffness*, dos músculos dos membros inferiores) e aprimorado por McMahon e Cheng (1990). Alguns estudos recentes, como o de Arampatzis et al. (2006) e Hunter et al. (2011), que demonstraram uma correlação inversa entre a rigidez dos flexores plantares e extensores do joelho com o gasto energético para sustentar uma velocidade submáxima de corrida, corroboram com o modelo da bola pingando.

Outro aspecto que parece interferir com a EC, e que também está relacionado à manifestação da força muscular, é o tempo de contato com o solo durante as passadas (KRAM & TAYLOR, 1990; ROBERTS et al., 1998). Nummela et al. (2007) demonstraram correlação positiva entre o tempo de contato com o solo durante a passada e o custo energético da corrida em velocidades elevadas. Esse aumento do gasto energético durante o contato pode ser explicado pela ativação de músculos agonistas, antagonistas, sinergistas e estabilizadores enquanto o pé está em contato com o solo. Também é razoável considerar que indivíduos com níveis elevados de força rápida apresentem menor tempo de contato com o solo durante a corrida. Lazzer et al. (2014) também demonstraram uma correlação positiva entre o índice de pegada (área, em  $\text{cm}^2$ , entre o eixo do pé e a trajetória do centro de pressão) e o gasto energético da corrida. Quanto menor essa área, maior a estabilidade do tornozelo e melhor a absorção e reaproveitamento da energia cinética durante a corrida, diminuindo o gasto energético e melhorando a EC.

A distribuição dos tipos de fibras também pode ser um fator importante para a EC. Sabe-se que fibras musculares do tipo II (de contração rápida) têm um custo metabólico contrátil menor do que as fibras do tipo I (HUNTER et al., 2001). Dessa forma, discute-se que indivíduos que apresentam maior distribuição desse tipo de fibra (seja devido ao treinamento de força ou a fatores genéticos) sejam mais econômicos durante a corrida, uma vez que o gasto energético das contrações musculares realizadas durante a corrida passa a ser dividido entre fibras do tipo I (oxidativas, que se valem prioritariamente do metabolismo oxidativo) e do tipo II (que se valem do metabolismo anaeróbio láctico e alático) (BOSCO et al., 1987; IAIA et al., 2009). Entretanto, também há evidências de que a distribuição do tipo de fibras não influencia a EC (WILLIAMS & CAVANAGH, 1987). Assume-se, também, que indivíduos que tenham experiência com o treinamento de força, além do de resistência, apresentem melhores índices de EC devido a melhoras na coordenação muscular, como diminuição da atividade de músculos antagonistas aos

utilizados durante a corrida, diminuindo os níveis de co-contracção durante essa atividade, e melhor sincronização de recrutamento das unidades motoras agonistas (FROST et al., 2002).

Um dos métodos mais eficazes de se demonstrar que a força muscular influencia significativamente a EC é a realização de estudos longitudinais randomizados e controlados envolvendo o treinamento de força e potência (DENADAI et al., 2017). Turner et al. (2003), por exemplo, demonstraram que seis semanas de treinamento pliométrico levam à melhora da EC medida em 3 intensidades diferentes em corredores amadores. Saunders et al. (2006) demonstraram o mesmo, porém, com atletas altamente treinados, após nove semanas de treinamento pliométrico (3 sessões semanais). Støren et al. (2008), por sua vez, identificaram melhoras na EC após 8 semanas de treinamento de força máxima em atletas altamente treinados. Essa melhora foi concomitante a incrementos, também, na taxa de desenvolvimento de torque, 1 repetição máxima em exercícios para os membros inferiores e tempo de exaustão na intensidade do consumo máximo de oxigênio dos voluntários. Millet et al. (2002) também identificaram melhoras na EC após treinamento de força máxima em atletas treinados, juntamente com melhoras na força máxima e no desempenho em saltos verticais. Os estudos citados acima são apenas uma parcela daqueles que demonstram que o treinamento de força gera adaptações que melhoram a EC. Nosso grupo recentemente conduziu uma revisão sistemática e meta-análise investigando os efeitos de diferentes tipos de treinamento de força na EC (DENADAI et al., 2017), na qual foi identificado que o treinamento de força máxima e explosiva contribuem igualmente para melhoras na EC. Também foi identificado que treinamentos de força com maior duração levam a melhorias mais acentuadas na EC. Cabe ressaltar que o treinamento de força e potência não altera exclusivamente a capacidade de produção de força, mas, também, outros aspectos relacionados ao sistema neuromuscular como a rigidez passiva do músculo, a sincronização do recrutamento das unidades motoras e a utilização do ciclo alongamento-encurtamento (ALBRACHT & ARAMPATZIS, 2013).

Outro modelo que investiga uma possível relação existente entre a EC e a força muscular é o de DM (para revisão, ler tópico 2.2). Enquanto estudos demonstram que o treinamento de força influencia na EC diminuindo o consumo de oxigênio durante corrida submáxima, os modelos de DM demonstram a mesma relação de maneira invertida: o comprometimento do sistema neuromuscular resultante desse fenômeno leva à piora da EC e ao aumento do consumo de oxigênio durante corrida submáxima (BRAUN & DUTTO, 2003; CHEN et al., 2007; BURT

et al., 2013). Esse modelo de estudo foi conduzido por diversos autores, induzindo o DM tanto por meio de contrações excêntricas de alta intensidade em exercícios resistidos (PASCHALIS et al., 2005; VASSILIS et al., 2008; BURT et al., 2013) quanto por meio de contrações de baixa intensidade aliadas ao estresse oxidativo, utilizando sessões de CrED (BRAUN & DUTTO, 2003; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2009).

Embora se discuta que a manifestação da dor muscular de início tardio possa, também, ser responsável pelas alterações na EC após o DM, levando à diminuição da amplitude e aumento da frequência de passadas (BRAUN & DUTTO, 2003), é razoável especular que o acometimento, principalmente, de fibras do tipo II durante esse fenômeno leve ao recrutamento de mais fibras oxidativas (tipo I) durante o exercício submáximo, aumentando a demanda metabólica da corrida (CHEN et al., 2009).

Em uma revisão recentemente publicada (ASSUMPTÃO et al., 2013), identificamos que, no caso do DM induzido por exercícios não relacionados à corrida (i.e. contrações excêntricas máximas, saltos, agachamentos), só ocorrem alterações na EC quando ela é mensurada durante corrida em velocidades elevadas (~90%  $VO_2max$ ). Já quando o DM é induzido por meio da CrED, alterações na EC são encontradas durante corrida em intensidades mais baixas (~65%  $VO_2max$ ), o que sugere um certo grau de especificidade relacionado ao DM e à EC.

Embora haja evidências de que a EC é prejudicada após o DM, há diferenças entre a cinética de recuperação dos marcadores deste (p.ex., força muscular) em relação aos de EC. Em estudo conduzido por Chen et al. (2007a), foram identificadas alterações significantes nos marcadores de DM e EC após uma CrED. Entretanto, a magnitude das alterações na EC foi menor do que a magnitude da perda de força (4-7% vs. 7-21%), assim como a recuperação da EC ocorreu de maneira mais rápida em relação à força muscular (4 dias vs. 5 dias, respectivamente). Esses dados são conflitantes com a noção de que a diminuição de EC após sessões danificadoras está relacionada à perda de força. Parte dessa dissociação entre a magnitude das alterações e a cinética de recuperação da EC e da força pode estar relacionada à especificidade da avaliação da força muscular, uma vez que, neste estudo (e em parte considerável dos demais), esta foi medida por meio de um exercício de cadeia cinética aberta enquanto a corrida é uma atividade de cadeia cinética fechada (ANDERSON, 1996). Støren et al. (2008) encontraram correlações significantes, porém fracas, entre os aumentos da força máxima e EC ( $R^2 = 0,38$ ;  $P < 0,01$ ) e da taxa de

desenvolvimento de força (TDF) e EC ( $R^2 = 0,26$ ;  $P < 0,05$ ), sendo que essas foram medidas por meio de meio-agachamento (exercício de cadeia cinética fechada).

Levando em conta que a magnitude da diminuição da EC parece estar relacionada à especificidade do exercício danificador (i.e. CrED, contrações excêntricas máximas ou saltos), pode-se supor que essa especificidade também se aplique à avaliação da força muscular. Assim, é possível hipotetizar que a magnitude das alterações (i.e., perda percentual) e a cinética da recuperação da força medida por meio de saltos (com e sem contra movimento), possam se assemelhar mais com as mudanças na EC após o DM induzido por CrED. Além disso, pode-se adicionar à hipótese anterior, que a TDF (i.e., uma medida da força explosiva), possa ser uma medida importante de ser controlada e comparada com a EC após o DM. Não há estudos de nosso conhecimento que tenham analisado a TDF e a EC após o DM. Pode-se considerar, então, que o modelo de DM induzido pelo exercício e, principalmente, por CrED, ainda tem muito a acrescentar no conhecimento a respeito da relação entre a EC e o força muscular.

## **2.2 Dano muscular induzido pelo exercício**

O DM é um fenômeno multifatorial que leva à perda de função muscular resultante do estresse imposto por uma ou mais sessões de exercício. Embora este fenômeno tenha sido amplamente investigado recentemente, ainda não há consenso a respeito de quais mecanismos causam esse rompimento do tecido muscular. Dois fatores têm sido apontados como importantes durante o processo de danificação do tecido muscular: estresse mecânico – em um evento primário – e estresse fisiológico – como uma resposta secundária – sendo que ambos podem ocorrer quando o DM se manifesta. Entretanto, a contribuição de cada um desses fatores para o processo de danificação do tecido e perda da função muscular ainda não foi claramente delimitada. Dessa forma, para melhor compreensão do fenômeno DM, os mecanismos acima apresentados serão revisados de maneira separada.

### **2.2.1 Fase primária do dano muscular**

Há algumas décadas, houve um esforço em compreender a dor muscular causada pelo exercício e seus mecanismos fisiológicos. Francis et al. (1983) revisaram os estudos existentes na

época a respeito de um fenômeno denominado como dor muscular de início tardio (DOMS), dividindo os mecanismos propostos em quatro grupos: acúmulo de ácido lático no músculo exercitado; espasmos musculares; rompimento de tecido contrátil; e danos no tecido conjuntivo. Todos os estudos revisados pelos autores corroboravam com a ideia de que contrações excêntricas induzem DOMS em magnitudes superiores aos demais tipos de contrações.

Com o avanço da tecnologia e novos estudos, foi confirmado que contrações excêntricas realmente causam níveis mais acentuados de DOMS, e de outros marcadores de DM, do que contrações isométricas e concêntricas (CLARKSON et al., 1986; NOSAKA & NEWTON, 2002). Essa resposta exacerbada da DOMS frente às contrações excêntricas parece estar relacionada a uma divisão da tensão externa entre estruturas contráteis (filamentos de actina e miosina) e não contráteis (titina, desmina,  $\alpha$ -actininas, etc) do sarcômero (LACOURPAILLE et al., 2014), sendo que a plasticidade das estruturas não contráteis é reduzida, as tornando mais suscetíveis ao rompimento e à desorganização estrutural. Morgan e Proske (2004) explicaram o rompimento dessas estruturas não contráteis formulando a hipótese do rompimento de sarcômeros (*popping sarcomere hypotheses*, em inglês). Essa hipótese afirma que os sarcômeros em série nas fibras musculares não são homogêneos e respondem de maneira diferente à tensão externa. Segundo os autores, com o incremento do comprimento das miofibrilas durante contrações excêntricas, as proteínas contráteis dos sarcômeros mais longos (e, conseqüentemente, mais fracos) deixam de se sobrepor em pontes cruzadas, deixando de produzir tensão ativa. Essa diminuição da tensão ativa é, então, compensada por um aumento na tensão passiva gerada pelas estruturas não contráteis supracitadas. Elevados níveis de tensão impostos sobre estruturas e proteínas não contráteis levam, então, ao rompimento da linha Z e à conseqüente desorganização da fibra muscular (LINDSTEDT et al., 2001). Esse primeiro evento danificador de caráter mecânico foi demonstrado por meio de análises histológicas como as realizadas por Lieber et al. (1996).

Cabe ressaltar que organelas não contráteis, como o retículo sarcoplasmático, o sarcolema e os túbulos T também podem ser rompidas em decorrência desse aumento da tensão passiva durante contrações excêntricas. Além disso, com o rompimento do sarcolema, ocorre um fluxo aumentado e descontrolado de  $Ca^{2+}$  para o citosol do miócito, comprometendo o acoplamento excitação-contração. Esses eventos, em conjunto com a desorganização da linha Z e o rompimento de proteínas contráteis, leva à perda de função muscular e à sinalização de uma fase secundária do DM, relacionada ao sistema imunológico (HIROSE et al., 2004).

### 2.2.2 Fase secundária do dano muscular

A segunda fase, de caráter inflamatório, do processo que leva ao DM ocorre imediatamente após a primeira fase, de caráter mecânico. O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio intracelular do miócito leva à degradação da membrana celular por meio de ativação de enzimas como a calpaína e a fosfolipase A2 (GISSEL, 2005; VERBOURG et al., 2005). O processo de degradação da membrana celular se torna cíclico, uma vez que a ativação dessas enzimas proteolíticas leva à degradação de fibras adjacentes que não haviam sofrido dano mecânico. Essa degradação aumenta a permeabilidade dos miócitos e, conseqüentemente, a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Adicionalmente, a combinação de contrações excêntricas e exercício aeróbio aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, produzidas na mitocôndria durante a cadeia respiratória, o que agrava o DM devido à peroxidação das membranas das fibras musculares (MASTALOUDIS et al., 2004).

O rompimento das membranas dos miócitos causa a liberação de eucosanoídeos na circulação, levando à diapedese (i.e., migração de leucócitos para a região danificada). Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegar ao tecido danificado, apresentando um pico de concentração aproximadamente um dia após o evento danificador (PIZZA et al., 2002). Uma vez no local danificado, os neutrófilos produzem quimiocinas  $\text{ELR}^+$  CXC, que atraem outros neutrófilos e iniciam a remoção de tecido danificado ou necrosado por meio de fagocitose (MATSUKAWA et al., 2000). Proteases lisossômicas e espécies reativas de oxigênio são produzidas durante o processo de fagocitose, causando dano secundário a fibras previamente danificadas pelo stress mecânico e danificando fibras adjacentes íntegras por meio de estresse oxidativo (PIZZA et al., 2005).

Depois dos neutrófilos, monócitos também migram para a região danificada, tornando-se macrófagos por meio de diferenciação, e apresentando picos de concentração entre 3 e 7 dias após a primeira fase do DM (KOH et al., 2003). Além de auxiliarem os neutrófilos no processo de fagocitose (entre 24 e 48 horas após a sessão danificadora), macrófagos também sinalizam para o reparo do tecido por meio de secreção de citocinas como a interleucina-6 (IL-6), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e o fator inibidor da leucemia (LIF), que



promovem a proliferação de mioblastos e a reparação do tecido (HAWKE et al., 2001). Dessa forma, enquanto os neutrófilos são responsáveis pela remoção do tecido danificado, os macrófagos realizam a mesma função, além de exercerem um papel importante no processo de reparação muscular após o DM.

A magnitude do processo inflamatório é regulada por citocinas pró- (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) e anti- (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) inflamatórias. Sendo assim, a produção e liberação de citocinas durante o processo inflamatório regula a resposta celular adaptativa. O equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias pode aumentar os níveis de proteção celular contra novos estímulos. Entretanto, magnitudes elevadas de DM podem promover uma resposta inflamatória intensa, aumentando a ocorrência de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (PILLON et al., 2013). Essa citocina, em particular, é sintetizada por macrófagos e outros tipos de células, incluindo o miócito, e é um dos agentes que regulam o metabolismo celular, apoptose, balanço proteico e sistema imunológico (SILVEIRA et al., 2007). Santos et al. (2004) demonstraram que os níveis de prostaglandina e TNF- $\alpha$  de sujeitos saudáveis aumentaram significativamente imediatamente após uma corrida de 30 km, continuando elevados até 24 horas após o exercício. Nieman et al. (2003) também observaram níveis elevados de TNF- $\alpha$  e outras citocinas (IL-1, IL-6 e IL-8) após três horas de corrida a 70%VO<sub>2</sub>max em atletas.

É razoável considerar que a intensidade da primeira fase do DM (i.e., estresse mecânico) regula a magnitude da resposta inflamatória durante a segunda fase (i.e., estresse metabólico). Entretanto, uma parte considerável do dano causado aos miócitos parece estar relacionada à resposta inflamatória e, em alguns casos, ao status oxidativo durante o primeiro evento danificador.

### 2.2.3 Efeito da carga repetida

Já foi bem estabelecido que, após sofrer DM, o tecido muscular se recupera torna-se menos suscetível ao mesmo. Dessa forma, se repetida, uma atividade danificadora induz alterações atenuadas nos principais sintomas de DM quando comparada à primeira vez em que foi realizada. Essa resposta atenuada dos marcadores de DM é atribuída a um fenômeno conhecido como o efeito da carga repetida (ECR) (HOWATSON & VAN SOMEREN, 2008;

LIMA & DENADAI, 2011). Embora muitos estudos tenham sido conduzidos para descobrir os mecanismos responsáveis por esse fenômeno, eles ainda não são completamente compreendidos.

McHugh (2003) revisou a literatura sobre os possíveis mecanismos que explicariam o ECR e os dividiu em três grandes grupos: adaptações neurais, mecânicas e celulares. Os estudos que propuseram que o ECR é conferido por adaptações neurais demonstraram que há um aumento no recrutamento de unidades motoras com predominância fibras de contração lenta (i.e., tipo I) durante contrações excêntricas após uma primeira sessão danificadora. Além disso, as unidades motoras do músculo previamente danificado passam a ser recrutadas de maneira mais sincronizada (McHUGH et al., 2001). Entre as alterações mecânicas propostas como mecanismos do ECR estão o aumento da rigidez muscular passiva após uma sessão danificadora (LACOURPAILLE et al., 2014) e o aumento do tecido conjuntivo (LAPIER et al., 1995) e da proteína estrutural desmina (BARASH et al., 2002) no músculo esquelético. Por fim, as adaptações celulares que parecem contribuir para o ECR são o aumento do número de sarcômeros em série nas miofibrilas após o dano inicial (BROCKET et al., 2001), fortalecimento do retículo sarcoplasmático (CLARKSON E TREMBLAY, 1988) e alterações na expressão de mediadores do processo inflamatório e proteínas de choque térmico (HUBAL et al., 2008). Embora divididos em três grupos separados por McHugh (2003) por motivos didáticos, acredita-se que esses mecanismos ocorram simultaneamente durante a manifestação do ECR. Entretanto, especula-se que a magnitude do dano inicial pode exercer influência sobre quais desses mecanismos predominam durante o processo de adaptação.

Embora importante e relevante em diversas situações, a proteção conferida pelo ECR pode ser contra indicada em determinados contextos, pois, para se manifestar, exige a indução de DM. Em alguns contextos competitivos, o DM severo é evitado, já que pode comprometer sessões de treinamento e, até mesmo, a duração do intervalo entre elas. O DM também pode comprometer a aderência em programas de atividade física por causa da manifestação da DOMS (GABBE et al., 2006). Em outros termos, induzir magnitudes elevadas de DM em indivíduos como forma de proteção contra esse mesmo fenômeno posteriormente pode não ser a melhor opção em todos os contextos. Portanto, outras estratégias de proteção que induzam pouco ou nenhum DM devem ser estudadas.

### **2.3 Contrações isométricas máximas como estratégia de proteção contra o dano muscular induzido pelo exercício**

Dentre diversas outras estratégias utilizadas para atenuar o DM, a realização de contrações isométricas máximas (CIM) alguns dias antes de sessões danificadoras parece ser uma alternativa eficiente e não danificadora. Juntamente com a realização prévia de contrações concêntricas (NOSAKA E CLARKSON, 1997) e excêntricas submáximas (CHEN et al., 2012a), essa estratégia vem sendo investigada recentemente em busca de métodos que protejam o músculo contra o DM induzindo pouco estresse sobre o tecido muscular. Com isso em mente, a realização de CIM parece ser uma alternativa eficiente e pouco danificadora.

O primeiro estudo de nosso conhecimento a investigar os efeitos da realização de CIM previamente a atividades danificadoras foi conduzido por Koh e Brooks (2001). Neste estudo, foi identificada proteção significativa contra o DM em ratos conferida pela realização de 75 CIM duas semanas antes de uma sessão danificadora. A perda de força dos ratos que realizaram as CIM foi significativamente menor (66%) do que a do grupo controle, sem serem identificadas diferenças em marcadores histológicos de DM em ambos os grupos. O estudo de Koh e Brooks (2001) foi o primeiro a identificar que o ECR pode ocorrer sem a manifestação de DM na sessão inicial (i.e., CIM) demonstrando, também, que a perda de função muscular que ocorre em quadros de DM parece não estar unicamente relacionada ao dano histológico.

Poucos estudos investigaram a manifestação do ECR induzido por CIM em humanos, sendo todos eles publicados pelo mesmo grupo de pesquisadores (CHEN et al., 2012a, 2012b, 2013, 2016). Nesses estudos, os autores manipularam variáveis importantes que comprovadamente interferem na magnitude do DM, e no ECR conferido por este, em modelos clássicos que induzem o DM com contrações excêntricas máximas (NOSAKA et al., 2001a; NOSAKA et al., 2005; LIMA & DENADAI, 2011). O estudo de Chen et al. (2013), por exemplo, demonstrou que a proteção conferida por duas CIM não é eficiente a longo prazo, durando até 4 dias após a realização das CIM e com um pico de proteção ocorrendo 2 dias após as mesmas. Também foi descoberto que são necessários pelo menos 2 dias para que esse efeito se manifeste. Entretanto, de acordo com o estudo de Chen et al. (2012b), quando o volume de CIM é grande (30 repetições), o ECR resultante é mais duradouro, ainda se manifestando 3 semanas após a realização das CIM. Porém, esse volume de CIM também leva à ocorrência de DM, mesmo sem a

realização de contrações excêntricas. Dessa forma, parece haver uma relação proporcional entre o volume de CIM e a duração do ECR resultante.

Chen et al. (2012a) demonstraram que a magnitude da proteção contra o DM induzida por CIM também é volume dependente. No estudo deles, embora ambos os volumes de CIM utilizados tenham conferido proteção significativa contra o DM, o grupo que realizou 10 CIM apresentou proteção maior do que o que realizou 2 CIM. Essa relação volume-proteção parece não ser linear, uma vez que a proteção conferida por 10 CIM foi aproximadamente duas vezes maior do que a conferida por 2 CIM; um volume cinco vezes menor. Essa mesma relação parece ocorrer quando contrações excêntricas submáximas são utilizadas como profilaxia contra o DM (NOSAKA et al., 2001a). Embora similares na relação volume-proteção, a realização de contrações excêntricas máximas antes de atividades danificadoras apresenta uma proteção contra o DM sensivelmente mais duradoura do que a realização de CIM, chegando a durar até nove meses (NOSAKA et al., 2001b). Por fim, Chen et al. (2012b) demonstraram que CIM realizadas com o músculo em estado alongado (20° de flexão do cotovelo) levam a uma proteção mais potente do que quando se realiza CIM com o músculo em um estado menos alongado (90°). Uma relação similar de proteção *vs* comprimento muscular em que a atividade profilática é realizada foi encontrada em estudos que utilizaram contrações excêntricas máximas (NOSAKA et al., 2005).

Uma das vantagens de se utilizar CIM como uma estratégia profilática contra o DM é a característica não danificadora desse tipo de atividade. Apenas um grupo dos estudos revisados acima apresentou alterações significantes em marcadores de DM após as CIM (CHEN et al., 2012b) devido ao elevado volume de contrações realizadas (30). Considerando o baixo custo e a aparente eficácia desse método profilático em proteger o sistema neuromuscular dos sintomas indesejáveis do DM, faz sentido investigar os seus efeitos em diferentes populações e grupos musculares. Em um artigo publicado recentemente, Tseng et al. (2016) demonstraram que 6 séries de 10 CIM dos músculos extensores do joelho, em estado alongado (90° de flexão), atenuaram as alterações em marcadores indiretos de DM induzidas por 6 séries de 10 MaxECC do mesmo grupo muscular, duas semanas depois. No entanto, o protocolo de pré-condicionamento utilizado por Tseng et al. (2016) apresenta maior volume de contrações (60 CIM), se comparado aos protocolos utilizados em músculos flexores do cotovelo (2, 10 ou 30

CIM), além de também ter induzido alterações significantes em sintomas de DM. Portanto, o único estudo que investigou a realização de CIM como atividade profilática contra o DM, adotou um alto volume de contrações que, conseqüentemente, levou à manifestação de sintomas de DM. Ainda há uma lacuna de conhecimento quanto ao volume de CIM necessário para a proteção contra o DM sem a manifestação do mesmo após o pré-condicionamento. Além disso, deve-se, também, estudar os efeitos desse tipo de pré-condicionamento em situações diferentes daquelas já investigadas como, por exemplo, corridas de longa distância e/ou em declive.

### 2.3.1 Possíveis mecanismos fisiológicos

Como os estudos que investigaram a realização de CIM como estratégia de proteção contra o DM foram pioneiros nessa área, não foram analisadas variáveis que pudessem evidenciar os mecanismos fisiológicos por trás dessa proteção. Entretanto, os autores desses estudos formularam hipóteses a esse respeito baseados em modelos que já haviam sido mais profundamente investigados. Um mecanismo em particular que foi proposto é o fortalecimento da matriz extracelular após a realização de CIM (CHEN et al., 2012a). Mackey et al. (2011) demonstraram que após o DM, ocorre uma desorganização da matriz extracelular, promovendo um destacamento entre células paralelas. Após a recuperação do DM, entretanto, há uma resposta adaptativa de reorganização e fortalecimento desse importante componente estrutural das células, dificultando futuros rompimentos e desorganizações induzidos pelo DM. Entretanto, para que isso ocorresse no estudo de Mackey et al. (2011), a atividade profilática induziu DM, que é algo que se evita com o uso de CIM. Ainda não há evidências demonstrando o fortalecimento da matriz extracelular sem a ocorrência prévia de DM.

Outro mecanismo que pode ser especulado como responsável pelas adaptações induzidas por CIM é uma possível mudança na expressão de genes relacionados à resposta adaptativa a espécies reativas de oxigênio. McArdle et al. (2004) identificaram que a expressão genética da enzima haem-oxigenase-1 foi aumentada após a realização de CIM, conferindo um efeito protetor contra o DM induzido pelo estresse oxidativo em ratos. Além disso, a *up-regulation* de proteínas de choque térmico também pode contribuir para o ECR conferido por CIM, uma vez que McArdle et al. (2001) demonstraram que a realização de alto volume deste tipo de atividade aumenta significativamente a expressão de proteínas de choque térmico.

Também se pode especular que a realização de CIM leve a uma proteção contra o DM relacionada ao sistema imunológico. Pizza et al. (2002) observaram aumentos significantes no acúmulo de neutrófilos em músculos de ratos após a realização de CIM que não induziram dano histológico. Nesse estudo, duas semanas após os ratos realizarem as CIM, foi identificado menor acúmulo de neutrófilos subsequentemente à realização de contrações excêntricas.

Pode-se considerar, também, que alterações na rigidez passiva dos músculos (i.e., *stiffness*, em inglês) induzidas pela realização de CIM podem ser um mecanismo adaptativo responsável pela atenuação do DM. McHugh et al. (1999) identificaram uma correlação negativa entre a complacência muscular e a susceptibilidade ao DM dividindo voluntários em diferentes grupos de acordo com os níveis de rigidez passiva de seus músculos flexores do joelho. Os voluntários com maior rigidez muscular passiva apresentaram alterações significativamente maiores em marcadores de DM após uma sessão danificadora do que os mais complacentes. Congruentemente, Kay e Blazevich (2009) identificaram diminuições agudas na rigidez muscular passiva após a realização de CIM, que duraram até 30 minutos, quando foi realizada a última medida. Se essa complacência muscular induzida por CIM for duradoura, ela também pode ser considerada como um dos mecanismos por trás da proteção contra o DM conferida por CIM.

Adaptações neurais, como o equilíbrio da ativação de unidades motoras de músculos agonistas e antagonistas, também podem justificar o ECR induzido por CIM. Green et al. (2014) demonstraram que, após a realização de 3 séries de 5 CIM, houve diminuição na ativação de músculos antagonistas e, simultaneamente, aumento da ativação e produção de força de músculos agonistas. A ativação de mais unidades motoras dos músculos agonistas resulta em uma divisão da tensão externa entre mais fibras musculares, diminuindo o estresse mecânico nos sarcômeros e, conseqüentemente, a magnitude do DM.

Em geral, o ECR conferido por CIM parece estar relacionado aos mecanismos acima descritos, que, em alguns casos, não dependem da ocorrência de DM para se manifestarem. Isso pode explicar, em partes, as diferenças entre a magnitude e a duração do ECR conferido por contrações excêntricas máximas e CIM. A ocorrência do DM após a realização de contrações excêntricas máximas leva a outros tipos de adaptação (e.g., adição de sarcômeros em série à miofibrila) que conferem maior resistência ao tecido muscular. Embora pouco estudada, a proteção contra o DM conferida por CIM parece ser uma estratégia viável e não danificadora. Há,

porém, lacunas de conhecimento no que diz respeito à manifestação dessa proteção em diferentes grupos musculares, populações ou, até mesmo, tipos de exercício (e.g. cadeia cinética aberta vs fechada).

## 2.4 Antocianinas

### 2.4.1 Antocianinas e marcadores de estresse oxidativo e inflamação

O consumo de suplementos nutricionais aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Há uma ampla gama de produtos no mercado que promovem (ou prometem promover) melhoras tanto na qualidade de vida, quanto no desempenho de atletas e entusiastas da atividade física (NOSAKA et al., 2006; BASSIT et al., 2010; ASKARI et al., 2013). Alguns compostos fitoquímicos figuram entre esses tipos de produtos (REBELLO et al., 2014). Encontradas em altas concentrações em todos os tecidos da maioria das frutas de cor escura, as ANN são compostos fenólicos cuja função *in natura* é proteger as folhas e frutos contra os raios ultravioletas solares (DAMAR & EKŞI, 2012), e vêm sendo extensivamente estudadas (BELL et al., 2014b). Quando consumidos por humanos, esses compostos fenólicos produzem um pronunciado efeito antioxidante e anti-inflamatório (SARIC et al., 2009).

Em um estudo *in vitro*, van Acker et al. (1995) demonstraram que as ANN desempenham uma função importante no sequestro do óxido nítrico, um radical livre produzido por macrófagos durante a fagocitose, que causa vasodilatação e pode levar a lesões nas membranas celulares quando em grandes concentrações. Os autores demonstraram que as ANN têm um poder de sequestro de óxido nítrico cem vezes mais potente do que o da glutatona, um composto antioxidante endógeno sintetizado pelo organismo humano. Wang et al. (1999), por sua vez, demonstraram que ANN presentes na cereja produzem uma ação antioxidante similar à produzida por suplementos antioxidantes comerciais e um efeito anti-inflamatório mais potente do que o de aspirinas. Esse efeito se dá por inibição da atividade enzimática das ciclo-oxigenases que, juntamente com as lipo-oxigenases, são responsáveis pela biossíntese de prostaglandinas e tromboxano, dois importantes mediadores do processo inflamatório (PEAKE et al., 2005). Os dados de Seeram et al (2001) corroboram com os de Wang et al. (1999) demonstrando, em análises *in vitro*, um efeito inibitório nas ciclo-oxigenases 1 e 2 induzido por cianidinas presentes

em cerejas e outras frutas de coloração escura. Também utilizando análises *in vitro*, Wang e Mazza (2002) investigaram os efeitos das ANN e outros compostos fenólicos na produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos ativados artificialmente. Os resultados obtidos foram uma diminuição significativa na concentração de óxido nítrico e, surpreendentemente, um aumento dose-dependente na produção de TNF- $\alpha$ , o que poderia contribuir para uma resposta inflamatória acentuada e agravamento do dano celular, que é o oposto do que se tem relatado após o consumo de produtos ricos em ANN.

Diversas frutas de cor vermelha ou escura são ricas em ANN. Parte considerável dos estudos que investigam a ação antioxidante e anti-inflamatória das ANN e outros compostos fenólicos utiliza a cereja amarela (*Prunus Cerasus L.*) devido ao alto teor desses compostos na fruta. Jacob et al. (2003), por exemplo, investigaram o efeito do consumo de aproximadamente 45 cerejas nos níveis plasmáticos de urato, proteína C-reativa (CRP), óxido nítrico e TNF- $\alpha$  em indivíduos saudáveis. Foram identificadas diminuições significantes em todos os marcadores, com exceção do TNF- $\alpha$ , que se manteve inalterado. Diminuições nos níveis plasmáticos de óxido nítrico e CRP após o consumo de ANN indicam um status antioxidante. De acordo com os autores, embora as ANN tenham se mostrado eficientes na inibição da atividade das ciclo-oxigenases *in vitro* (SEERAM et al., 2001), a ausência de alterações no TNF- $\alpha$  podem indicar que o consumo *in vivo* de frutos ricos em ANN pode não influenciar alguns mediadores do processo inflamatório.

Utilizando um modelo similar ao de Jacob et al. (2003), Bell et al. (2014a) investigaram os efeitos do consumo de duas diferentes dosagens de um concentrado de cerejas amarelas (30 e 60 ml) nos níveis séricos e urinários de urato e no status antioxidante de indivíduos saudáveis. Foi identificado que os indivíduos que consumiram uma dosagem maior de cerejas (60 ml) apresentaram um status antioxidante maior e maior eficiência no processo de eliminação de urato pela urina, com diminuição dos níveis séricos e aumento dos níveis urinários de urato. Kelley et al. (2006) também demonstraram um aumento no status antioxidante após o consumo de 45 cerejas, sem alterações significantes nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6.

Baseado nos estudos acima descritos é possível identificar a manifestação de um efeito antioxidante conferido por ANN e outros compostos fenólicos presentes em alguns tipos de frutos, mesmo em situações basais. Entretanto, esses fitoquímicos parecem não influenciar



significativamente a atividade de importantes mediadores do processo inflamatório em condições basais, apenas atuando no sequestro dos radicais livres produzidos por neutrófilos e macrófagos, também em condições basais. Embora ineficazes no controle de mediadores inflamatórios nessas situações, as ANN parecem ser efetivas no combate contra a inflamação após eventos estressores, como o exercício.

#### 2.4.2 Antocianinas e o dano muscular induzido pelo exercício

Além de serem benéficos para pacientes com artrite reumática e gota (JACOB et al., 2003), os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios das ANN podem, também, beneficiar atletas e entusiastas da prática de atividade física que pretendem evitar elevadas magnitude de DM. Levando em consideração que a resposta inflamatória a um primeiro evento danificador resulta em agravamento do DM por meio de fagocitose e estresse oxidativo (HOWATSON & VAN SOMEREN, 2008), o consumo de produtos ricos em ANN pode ser considerado como uma alternativa viável de prevenção e/ou recuperação da integridade do tecido muscular.

Um dos primeiros estudos a investigar os efeitos do consumo de cerejas ricas em ANN na proteção contra o DM foi realizado por Connolly et al. (2006). Nesse estudo, foi identificado que os voluntários que consumiram cerejas apresentaram alterações menos acentuadas na força muscular e na DOMS do que voluntários que consumiram um placebo sem propriedades fitoquímicas após a realização de duas séries de 20 contrações excêntricas máximas com os extensores do cotovelo. Embora nenhum marcador de estresse oxidativo ou inflamação tenha sido coletado, os autores especularam que as ANN presentes nas cerejas consumidas conferiram um efeito antioxidante e anti-inflamatório que atenuou a fase secundária do DM. Entretanto, o uso de um desenho experimental de *cross-over* no estudo de Connolly et al. (2006) pode ser considerado como uma limitação, uma vez que os voluntários podem ter se beneficiado do ECR após a recuperação da primeira sessão de indução de DM.

Eliminando a limitação do desenho experimental de Connolly et al. (2006), Kuehl et al. (2010) compararam o efeito do consumo de cerejas vs placebo no DM induzido por uma corrida em revezamento em descida (na qual os atletas corriam pelo menos 20 km) separando os voluntários em dois grupos randomicamente. Os resultados obtidos foram similares aos de

Connolly et al. (2006), com redução significativa na dor muscular imediatamente após a corrida apenas para o grupo que consumiu as ANN. Kuehl et al. (2010) também especularam que a ação antioxidante e anti-inflamatória das ANN atuou na proteção contra a dor muscular e adicionaram que a manifestação aguda de dor muscular no grupo placebo (incomum em para esse marcador de DM, que possui uma característica tardia) pode ter sido induzida pelo aumento da sensibilidade das terminações nervosas livres frente à presença de espécies reativas de oxigênio, o que também justificaria a diminuição da dor no grupo experimental. Embora Connolly et al. (2006) e Kuehl et al. (2010) não tenham investigado marcadores moleculares do status oxidativo e inflamatório, seus estudos foram importantes para identificar os benefícios do consumo de ANN e outros compostos fenólicos em situações estressantes para o organismo.

Howatson et al (2010) conduziram o primeiro estudo de nosso conhecimento a investigar os efeitos do consumo de cerejas ricas em ANN em marcadores de DM com análise concomitante de marcadores de status oxidativo e inflamatório. Os autores dividiram corredores que participariam da maratona de Londres em grupo placebo (suco de frutas sem propriedades fitoquímicas) e experimental (suco de cereja rico em ANN). Todos os participantes consumiram seus respectivos sucos nos cinco dias que antecederam à maratona, durante a mesma e nos dois dias subsequentes a ela. Marcadores de DM e status oxidativo e inflamatório foram coletados antes, imediatamente após e dois dias após a prova. O único marcador de DM que obteve alterações significativamente diferentes entre os grupos foi a força muscular, que apresentou queda similar imediatamente após a prova, mas recuperação mais acelerada para o grupo experimental, retornando aos níveis basais dois dias após a maratona. O grupo placebo apresentou níveis significativamente maiores de marcadores inflamatórios como CRP, IL-6 e ácido úrico imediatamente após a prova, quando comparados com os do grupo experimental. Essa diferença se manteve até 48 horas após a maratona. O status oxidativo total também foi maior para o grupo placebo imediatamente e 48 horas após a maratona.

Os resultados de Howatson et al. (2010) são similares aos de Connolly et al. (2006) e Kuehl et al. (2010), com a adição do acompanhamento de marcadores de status oxidativo e inflamatório, demonstrando não só os resultados funcionais do consumo de alimentos ricos em ANN (i.e., atenuação de marcadores de DM), como também os mecanismos responsáveis por essa proteção. Entretanto, a utilização de um placebo com adição de carboidratos pode ser

considerada uma limitação do estudo de Howatson et al (2010). Febbraio et al. (2003) demonstraram que o consumo de carboidratos pode atenuar a resposta de IL-6. Porém, Bell et al. (2014a) demonstraram que o consumo de um composto rico em ANN levou à atenuação significativa da resposta de IL-6 após o exercício, quando comparado com o consumo de um placebo isocalórico. Ademais, os resultados de Howatson et al. (2010) diferiram dos de Kelley et al. (2006), no que diz respeito à atenuação do processo inflamatório. A ausência de atenuação da atividade das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  no estudo de Kelley et al. (2006) parece, considerados os dados de Howatson et al. (2010), estar relacionada à ausência de um estímulo estressor para o sistema inflamatório justificando, então, a similaridade dos mediadores de inflamação entre grupos placebo e experimental. Em outras palavras, quando consumidas em situações basais (i.e., sem a presença de uma atividade estressora que sinalize um status pró-inflamatório) as ANN parecem não ser efetivas no controle de mediadores da inflamação. Entretanto, quando há um agente estressor, esses compostos fenólicos parecem atenuar significativamente o status pró-inflamatório.

Bowtell et al. (2011) também investigaram a influência do consumo de cerejas ricas em ANN na resposta oxidativa e marcadores de DM após uma sessão de exercício estressante ao músculo esquelético. O estudo foi realizado com um delineamento experimental de *cross-over* em que os voluntários consumiram um concentrado de cerejas rico em compostos fenólicos e ANN ou um placebo (suco de frutas sem propriedades fitoquímicas) sete dias antes, durante e dois dias após a realização de um protocolo de exercício resistido intenso (10 séries de 10 contrações dos extensores do joelho com carga de 80%1RM). Os resultados obtidos corroboraram com os de Howatson et al. (2010), demonstrando diminuições na força muscular imediatamente após a sessão de exercício com recuperação acelerada quando associada ao consumo do suco de cerejas. O status oxidativo, medido por carbonilas proteicas, foi maior para o grupo placebo em todos os momentos pós-exercício. Embora tenham demonstrado que o consumo de alimentos ricos em ANN parece atenuar os sintomas do DM por meio de regulação do status inflamatório e oxidativo, a utilização de um delineamento experimental de *cross-over* pode ser considerada como uma limitação do estudo de Bowtell et al. (2011), assim como no de Connolly et al. (2006). Mesmo considerando que os estudos utilizaram membros diferentes nas duas fases do estudo, há evidências de transferência do ECR para o membro contra lateral,

resultante de adaptações neurais ao exercício excêntrico (HOWATSON & VAN SOMEREN, 2007; XIN et al., 2014).

Metade dos estudos acima revisados utilizou contrações excêntricas intensas (CONNOLLY et al., 2006; BOWTELL et al., 2011) como exercício danificador. A outra metade utilizou atividades que combinam contrações excêntricas com pouco estresse mecânico e altos níveis de estresse oxidativo simultaneamente (HOWATSON et al., 2010; KUEHL et al., 2010). O consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e ANN apresentou atenuação e/ou recuperação mais rápida dos marcadores de DM em ambos os tipos de estimulação. Porém, considerando as diferenças existentes entre esses tipos de estímulo, Bell et al. (2015) investigaram a influência do consumo de um suco de cerejas rico em ANN na proteção contra o DM induzido pelo estresse oxidativo na ausência de ruptura mecânica ao tecido muscular (i.e., sem a realização de contrações excêntricas). Para tanto, os autores recrutaram ciclistas treinados e os separaram em grupo placebo e experimental, que consumiram um suco sem propriedades fitoquímicas e um suco de cereja rico em ANN, respectivamente. Ambos os grupos realizaram 9 séries de 66 *sprints* em uma bicicleta estacionária. Foram coletados dados referentes ao estresse oxidativo, sintomas de DM e desempenho de força, potência e eficiência no ciclismo antes e de 1 a 3 dias após a realização dos *sprints*.

Os resultados obtidos por Bell et al. (2015) demonstraram queda da força muscular dos extensores do joelho apenas para o grupo placebo, após os *sprints*. O mesmo ocorreu com a eficiência no ciclismo. Foi identificada, também, queda significativa na potência em tiro de 6 segundos, porém, sem diferença significativa entre os grupos. Também foram identificadas alterações sem diferença entre grupos para a dor muscular, níveis de TNF- $\alpha$ , IL-8 e CK. Entretanto, ambos os grupos apresentaram aumentos significantes de IL-6 e CRP, com valores significativamente maiores para o grupo controle. Os dados obtidos no estudo de Bell et al. (2015) confirmam que o consumo de alimentos ricos em ANN leva a uma redução do status oxidativo e inflamatório podendo, inclusive, atenuar o comprometimento da performance, mesmo após sessões de exercício que não danifiquem mecanicamente o tecido muscular. Ademais, a atenuação simultânea na perda de força dos músculos de membros inferiores e na eficiência de ciclismo parece acrescentar ao conhecimento da relação entre a força muscular a eficiência em exercício aeróbio. Embora essa relação tenha sido demonstrada em ciclistas, há uma lacuna na

literatura no que diz respeito à atenuação de alterações na economia de corrida conferida pelo consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e ANN. Considerando os estudos acima citados, que demonstram proteção conferida por esses tipos de compostos contra o DM induzido por corridas e contrações excêntricas intensas, seria interessante investigar se essa proteção se manifestaria, também, na diminuição da economia de corrida.

## 2.5 Polimorfismo do gene ACTN3 e as $\alpha$ -actininas

As  $\alpha$ -actininas estão entre as muitas proteínas estruturais responsáveis pela organização e estruturação mecânica de diversos tipos de células e, dentre elas, a muscular (PASQUA et al., 2011). Há quatro diferentes tipos de  $\alpha$ -actininas, sendo que duas delas são encontradas exclusivamente no miócito: as  $\alpha$ -actininas-2 e -3 (BLANCHARD et al., 1989). A função primária dessas proteínas na célula muscular é a ancoragem dos filamentos de actina na linha Z, conferindo aos sarcômeros a sua característica serial e dando suporte à contração muscular por pontes cruzadas (BLANCHARD et al., 1989). Entretanto, além de se ligarem às proteínas contrateis, as  $\alpha$ -actininas-2 e -3 possuem uma ampla rede de ligações com outras proteínas que exercem diversas funções como, por exemplo, a calsarcina-2 (que se liga à calmodulina), titina (que confere suporte estrutural para a organização longitudinal do sarcômero) e desmina (que conecta as linhas Z de sarcômeros de miofibrilas adjacentes ao sarcolema) (SETO et al., 2011). A  $\alpha$ -actinina-3 é expressa exclusivamente em fibras musculares de contração rápida (tipos IIa e IIb) enquanto a  $\alpha$ -actinina-2 pode ser encontrada tanto em fibras musculares de contração lenta (tipo I) quanto nas de contração rápida (MILLS et al., 2001).

A síntese das  $\alpha$ -actininas é codificada pelos genes ACTN2 e ACTN3. Acredita-se que, há mais de um milhão de anos (MacARTHUR et al., 2007), ocorreu um polimorfismo do tipo *nonsense* no gene ACTN3, levando à troca do nucleotídeo C para T na posição 1747 do éxon 16, e a uma conversão para um *stop codon* no resíduo 577 (R577X), o que acarreta na produção de uma forma truncada da  $\alpha$ -actinina-3 (NORTH et al., 1999). Desse modo, indivíduos homocigotos para o alelo polimórfico (genótipo XX) não sintetizam a forma funcional da  $\alpha$ -actinina-3 e a ausência desta é suplantada pelo aumento da expressão da  $\alpha$ -actinina-2 (VIREL & BACKMAN, 2004). Estima-se que esses indivíduos representem aproximadamente 20% da população mundial geral (NORTH et al., 1999; AMORIM et al., 2015). Indivíduos heterocigotos (genótipo RX)

sintetizam a  $\alpha$ -actinina-3, porém, em menor escala do que indivíduos homocigotos para o alelo R (genótipo RR) (VIREL & BACKMAN, 2004).

A substituição total da  $\alpha$ -actinina-3 por  $\alpha$ -actinina-2 em indivíduos do genótipo XX leva a uma *up-regulation* de proteínas de maior afinidade com a  $\alpha$ -actinina-2, como é o caso da miotilina. A miotilina é uma proteína pouco expressa em fibras musculares do tipo II que, em função da abundância da  $\alpha$ -actinina-2 em indivíduos XX (e de sua afinidade com essa proteína), passa a ser mais comum nessas (SETO et al., 2011). O mesmo ocorre com outras proteínas como a desmina (GOLDFARB et al., 1998),  $\alpha\beta$ -cristalina (VICART et al., 1998),  $\gamma$ -filamina (VORGERD et al., 2005) e ZASP (SELCEN & ENGEL, 2005). O aumento da expressão dessas proteínas em função da ausência da  $\alpha$ -actinina-3 leva a diferenças na organização estrutural e funcional dos sarcômeros culminando, inclusive, na diferenciação de fibras de contração rápida para fibras de contração lenta.

Outra alteração interessante induzida pelo polimorfismo R577X é a diminuição da atividade da enzima glicogênio fosforilase, que dá início ao processo de glicogenólise. Embora essa enzima seja expressa de maneira similar entre indivíduos com e sem esse polimorfismo, sua atividade é reduzida significativamente naqueles que não sintetizam a  $\alpha$ -actinina-3, favorecendo a utilização do metabolismo aeróbio em detrimento do anaeróbio láctico (QUINLAN et al., 2010; LEE et al., 2016).

Outro fenômeno que leva a alterações funcionais em indivíduos XX é o aumento das ligações entre as  $\alpha$ -actininas-2 e a calsarcina-2. Em indivíduos heterocigotos e RR, a calsarcina-2 se liga à calcineurina inibindo a atividade desta fosfatase  $\text{Ca}^{2+}$  CaM-dependente que promove a conversão de fibras de contração rápida para fibras de contração lenta (DELLING et al., 2000). O maior número de ligações entre calsarcina-2 e  $\alpha$ -actinina-2, devido à abundância desta proteína em indivíduos XX, reduz as ligações entre a primeira e a calcineurina, aumentando a atividade desta e levando à conversão de fibras musculares de contração rápida para fibras de contração lenta (SETO et al., 2013). Também foram identificadas taxas de liberação e reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  mais rápidas por parte do retículo sarcoplasmático em indivíduos R577X (HEAD et al., 2015). Essas alterações parecem ocorrer devido à ocorrência de níveis elevados da enzima SERCA1 e da proteína calsequestrina nesses indivíduos, em decorrência desse polimorfismo. Essas alterações levam a maior resistência à fadiga e maior dispêndio energético para a manutenção da

homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , o que, por sua vez, aumenta a temperatura basal de indivíduos XX (HEAD et al., 2015).

Embora influencie o desempenho muscular, o polimorfismo R577X não leva a nenhuma miopatia ou má formação em seus portadores (LEE et al., 2016). Na verdade, acredita-se que esse polimorfismo tenha sido passado adiante por conferir vantagens evolutivas para algumas tribos (AMORIM et al., 2015). O aumento da temperatura basal, por exemplo, pode ser considerado como benéfico para populações que viviam em ambientes frios (FRIEDLANDER et al., 2013; AMORIM et al., 2015). Além disso, uma maior resistência à fadiga pode ter sido interessante durante a migração da espécie humana do continente africano para a eurásia, região com menor diversidade de fauna e, conseqüentemente, menor aporte calórico proveniente da caça (FRIEDLANDER et al., 2013; AMORIM et al., 2015) favorecendo, também, a caça por persistência, que consiste, basicamente, da perseguição de presas mais velozes por longas distâncias, as levando a exaustão.

### 2.5.1 ACTN3 e desempenho

Após a descoberta do polimorfismo R577X do gene ACTN3, diversos estudos foram conduzidos para investigar a distribuição deste e a sua relação com o desempenho em atividades esportivas. Como citado acima, é estimado que 20% da população mundial geral possua o genótipo XX do gene ACTN3 (AMORIM et al., 2015). Entretanto, ao se considerar apenas atletas de alto rendimento, essa porcentagem tende a ser sensivelmente diferente.

Yang et al. (2003) conduziram um estudo genotipando indivíduos não atletas e atletas de alto nível de diferentes modalidades e identificaram que atletas de modalidades com predominância do metabolismo aeróbio apresentaram frequência do genótipo XX de 24%, enquanto atletas de modalidades altamente dependentes da força muscular apresentaram uma frequência de 6% desse genótipo. Os indivíduos que não eram atletas de nenhuma modalidade apresentaram 18% de frequência do genótipo XX. Seguindo a mesma lógica, foi identificada frequência de 53% do genótipo RR dentre os atletas de modalidades altamente dependentes da força muscular e de 28% e 30% em atletas de modalidades predominantemente aeróbias e não atletas, respectivamente. Os dados de Yang et al. (2003) sugerem uma relação positiva entre o

polimorfismo R577X e o desempenho em atividades aeróbias, assim como uma relação positiva entre o genótipo RR e atividades de força e potência.

Em um modelo de estudo similar, Druzhevskaya et al. (2008) compararam a ocorrência do polimorfismo R577X em atletas russos de força e potência muscular e não-atletas. Foi identificada uma frequência de 6,4% do genótipo XX nos atletas de força e potência *versus* 14,2% em não atletas. Os dados de Eynon et al. (2009) corroboram com os de Yang et al. (2003) e Druzhevskaya et al. (2008). Nesse estudo, os autores compararam a frequência do polimorfismo R577X em não atletas e corredores fundistas e velocistas israelenses que competiam em alto nível. Foi identificada uma frequência maior do genótipo XX entre os atletas fundistas (34%) quando comparado aos velocistas (13%) e aos não atletas (18%).

Baseado nos estudos acima descritos fica claro que há uma relação entre a capacidade de sintetizar a proteína  $\alpha$ -actinina-3 e o desempenho esportivo de alto nível. Deve-se considerar, porém, que essa distribuição é fruto de uma amostra dos atletas que mais se destacam em suas respectivas modalidades e que, mesmo havendo uma predominância de determinado genótipo em uma modalidade, os indivíduos com o genótipo “adverso” (e.g., XX para praticantes de esportes de força e potência) também podem chegar a níveis elevados de desempenho, desde que passem por uma rotina de treinamento adequada. Também é interessante considerar que nem sempre as capacidades físicas que envolvem força/potência e resistência são antagônicas. Para se desenvolver níveis ótimos de EC, por exemplo, é necessário levar em consideração, entre diversos outros fatores, aspectos relacionados à capacidade de produção de força e a capacidade aeróbia. Com isso em mente, um modelo que seja capaz de manipular essas duas variáveis pode vir a fornecer informações importantes acerca dessa medida de desempenho.

De fato, Pasqua et al. (2015) investigaram a influência das três diferentes combinações do alelo polimórfico R577 do gene ACTN3 no custo de locomoção. O custo de locomoção é uma variável similar à EC, que quantifica o gasto calórico (medido pelo consumo de oxigênio, em calorimetria indireta) utilizado para cobrir determinada distância ( $\text{Kcal}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Para tanto, Pasqua et al. (2015) genotiparam cento e cinquenta indivíduos e mediram seus custos de locomoção correndo a 10 e 12  $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$ . Foi identificado, para a velocidade de 10  $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$ , que os indivíduos heterozigotos apresentaram um custo de locomoção menor do que indivíduos XX, sem diferença em relação aos RR e, também, sem diferenças entre os custos de locomoção dos indivíduos



homozigotos (RR vs XX). Já à velocidade de 12 km.h<sup>-1</sup>, foi identificado um custo de locomoção significativamente menor para os indivíduos heterozigotos em relação aos indivíduos homozigotos de ambos os alelos (XX e RR). Esses dados parecem confirmar a hipótese de que, uma vez que a EC (ou o custo de locomoção, no caso) é dependente tanto de aspectos neuromusculares quanto de fisiológicos, indivíduos que são heterozigotos para o alelo R577 do gene ACTN3 parecem se beneficiar das vantagens relacionadas a ambos esses sistemas conferidas pelos alelos X e R. Considerando esses dados, parece razoável assumir que a EC é uma variável que influencia agudamente o desempenho aeróbio em função de características neuromusculares. Além disso, este estudo abre uma lacuna na literatura no que diz respeito a eventuais alterações na força muscular de indivíduos com diferentes polimorfismos do gene ACTN3 e a consequente resposta da EC.

#### 2.5.2 ACTN3 e o dano muscular induzido pelo exercício

Considerando a relação existente entre o polimorfismo R577 do gene ACTN3, a síntese de proteínas estruturais da linha Z, e o desempenho em atividades aeróbias e anaeróbias, é razoável considerar que essa relação pode afetar, também, a resposta de marcadores de DM frente a um estímulo danificador.

Clarkson et al. (2005) genotiparam 157 voluntários, dividindo-os entre os três polimorfismos do gene ACTN3, e monitoraram alterações na força muscular e CK deles em resposta a uma sessão de exercícios excêntricos com os flexores do cotovelo. Foi identificada menor atividade sérica de CK em indivíduos XX, quando comparados a indivíduos heterozigotos e RR em condições basais. Embora interessante, os autores consideram que esse dado pode não estar relacionado exclusivamente ao polimorfismo R577X, mas a outros fatores como uma eventual diferença na massa muscular entre os grupos, sendo que a massa muscular é diretamente proporcional à atividade sérica de CK em estado basal (BRANCACCIO et al., 2007). Outro fator que pode ter interferido na atividade basal de CK é a etnia, uma vez que a porcentagem de asiáticos no grupo XX foi maior do que nos demais. Quanto à susceptibilidade ao DM, não houve diferença nas alterações de marcadores de DM entre indivíduos de diferentes genótipos, refutando a hipótese dos autores de que indivíduos XX, por não sintetizarem a  $\alpha$ -actinina-3, apresentariam alterações maiores nesses marcadores.

Utilizando uma abordagem similar, Vincent et al. (2010) investigaram diferenças em marcadores indiretos de DM após a realização de 4 séries de 20 contrações excêntricas dos extensores do joelho em indivíduos XX e RR, desconsiderando indivíduos heterozigotos. Não foi identificada diferença significativa na atividade sérica de CK entre os dois grupos, embora os autores tenham especulado sobre uma possível tendência do grupo XX apresentar valores maiores de CK ( $p = 0,1$ ). A dor muscular reportada pelos voluntários foi, entretanto, significativamente maior para esse grupo. Dentre os diversos marcadores bioquímicos de DM coletados, foi identificado efeito do polimorfismo do gene ACTN3 nas alterações da proteína CSRP3, que interage com a titina no sarcômeros, tendo como função a sensação de estiramento muscular (LEHTI et al., 2009), com alterações mais evidentes em indivíduos RR. Embora Vincent et al. (2010) tenham discutido que os resultados obtidos apontam para um efeito protetor da  $\alpha$ -actinina-3 (exclusivamente sintetizada em indivíduos RR), acreditamos que esse efeito não é tão evidente, uma vez que o único marcador indireto de DM que apresentou tal efeito estatisticamente foi a dor muscular, que é influenciada por fatores subjetivos. Em contraste, o aumento da CSRP3 foi maior para o grupo RR, conflitando com a noção de que as  $\alpha$ -actininas-3 protegeriam contra o DM.

Pimenta et al. (2011) também buscaram identificar se o polimorfismo do gene ACTN3 influencia a susceptibilidade ao DM em atletas profissionais de futebol. Para tanto, os atletas foram separados em grupos, de acordo com seus polimorfismos genéticos, e passaram por uma sessão de treinamento resistido com foco em contrações excêntricas (saltos, mudanças de direção, aceleração e desaceleração de sprints). Foram monitorados, entre outros marcadores hormonais relacionados ao estresse e à adaptação ao treinamento, três marcadores indiretos de DM: atividade sérica de CK, concentração sérica de  $\alpha$ -actininas e IL-6. Duas e quatro horas após a sessão de treinamento, o grupo XX apresentou aumentos significativamente maiores na IL-6 do que o grupo RR. Foi identificado, também, que a concentração sérica de  $\alpha$ -actininas foi significativamente maior para o grupo XX imediatamente e duas horas após o treinamento, em relação ao grupo RR. Também foi identificada maior atividade sérica de CK 4 horas após a sessão de treinamento para o grupo XX, quando comparado com o grupo RR. Embora tenha identificado que indivíduos XX são mais suscetíveis ao DM, baseado em marcadores bioquímicos, Pimenta et al. (2012) utilizaram uma população treinada, fator que pode ter interferido nos resultados. Sabe-se que grupos musculares previamente expostos ao DM

apresentam alterações atenuadas em marcadores de DM após exercícios danificadores devido à manifestação do ECR (McHUGH, 2003; CHEN et al., 2011a; LIMA & DENADAI, 2011). Dessa forma, o efeito protetor fenotípico conferido pelo treinamento resistido pode ser considerado como um fator de confusão.

Cabe ressaltar que os estudos de Clarkson et al. (2005), Vincent et al. (2010) e Pimenta et al. (2012) coletaram apenas marcadores bioquímicos e subjetivos de DM, não investigando a influência do polimorfismo do gene ACTN3 na força muscular, que, além de ser um dos principais e mais confiáveis marcadores de DM, é a variável mais estudada quando se trata desse gene.

O estudo de Seto et al. (2011) sanou as limitações acima discutidas dos estudos de Clarkson et al. (2005), Vincent et al. (2010) e Pimenta et al. (2012) investigando a influência do polimorfismo do gene ACTN3 na resposta ao DM medindo, também, o força muscular. Para tanto, camundongos *knockout* para o alelo R do polimorfismo R577 do gene ACTN3 (genótipo XX) e homocigotos para esse mesmo alelo (genótipo RR) passaram por um protocolo de contrações excêntricas máximas induzidas por eletroestimulação. Foi identificada queda de força de ~40% nos camundongos XX e ~16% nos RR, apresentando diferença estatisticamente significativa. Os autores também identificaram que a ausência da  $\alpha$ -actinina-3 nos camundongos *knockout* leva a uma reorganização da estrutura da linha Z, frente ao *up regulation* da  $\alpha$ -actinina-2, com maior afinidade com proteínas como a ZASP, titina e vinculina, que se distribuem de maneira diferente no sarcômeros, conferindo menos resistência à linha Z e, conseqüentemente, tornando o músculo desses animais mais suscetível ao DM.

O estudo mais completo, de nosso conhecimento, sobre a relação entre polimorfismos genéticos do gene ACTN3 e susceptibilidade ao DM foi conduzido por Venckunas et al. (2012). Neste estudo, indivíduos foram separados em grupos de genótipos XX e RR e realizaram duas sessões de cinquenta *drop-jumps* separadas por duas semanas. Foram monitorados marcadores indiretos de DM muscular antes, imediatamente após e 2 e 7 dias após ambas as sessões. Os marcadores de DM foram divididos entre funcionais (altura de salto com contra-movimento, pico de torque isocinético, pico de torque isométrico voluntário e pico de torque isométrico com estimulação elétrica) e não funcionais (atividade sérica de CK e dor muscular). A realização de duas diferentes sessões danificadoras foi proposta pelos autores para investigar, além da

susceptibilidade ao DM, a manifestação do ECR e a sua relação com o polimorfismo do gene ACTN3.

Os resultados obtidos por Venckunas et al. (2012) demonstraram claramente a manifestação do ECR para marcadores funcionais e não funcionais da DM. Não foi identificada diferença entre os polimorfismos do gene ACTN3 quanto à manifestação do ECR. Entretanto, o dado mais interessante deste estudo foi a maior susceptibilidade ao DM do grupo RR, demonstrada por diminuições mais acentuadas na produção de torque isométrico e isocinético voluntário imediatamente após a primeira sessão de *drop-jumps*, quando comparadas às do grupo XX. Nos demais momentos de coleta, e entre outros marcadores, não houve diferença entre grupos. Esses achados são conflitantes com o que foi relatado em modelo animal por Seto et al. (2011), em atletas treinados por Pimenta et al. (2012), e em humanos não treinados por meio de marcadores bioquímicos e de dor muscular por Clarkson et al. (2005) e Vincent et al. (2010).

Venckunas et al. (2012) discutem que essa proteção parcial contra o dano inicial (de caráter mecânico) em indivíduos XX pode estar relacionada ao fato de esses indivíduos serem inicialmente mais suscetíveis ao DM e, ao longo da vida, se tornarem mais protegidos contra o mesmo devido a um ECR conferido por atividades de vida diária. Esse fenômeno já foi observado por Chen et al. (2011a) e Lima e Denadai (2011) entre grupos musculares que sofrem exposições diferentes ao DM em atividades corriqueiras (extensores do joelho *vs* flexores do cotovelo). Os dados de Seto et al. (2011) podem corroborar com essa hipótese, uma vez que os ratos *knockout* para a  $\alpha$ -actinina-3 sofreram maior DM, o que os levaria a sofrer magnitudes menores deste em sessões subsequentes. O acúmulo de sessões danificadoras em indivíduos XX em longo prazo pode levar, então, à menor susceptibilidade destes ao DM, como identificado por Venckunas et al. (2012). O mesmo se aplica aos estudos de Clarkson et al. (2005) e Vincent et al. (2010), mas não ao de Pimenta et al. (2012), que estudou atletas altamente expostos ao DM em ambos os grupos.

Recentemente, alguns estudos foram publicados investigando as respostas ao DM induzido por atividades de ultra-endurance em indivíduos que expressam, ou não, a proteína  $\alpha$ -actinina-3 (BELLI et al., 2017; DEL COSO et al., 2017a; DEL COSO et al., 2017b). Duas características em comum entre esses estudos foram: 1) a divisão dos voluntários em grupos de acordo com a presença (genótipo RR) ou não (genótipos RX e XX) do alelo polimórfico X, que

limita síntese da  $\alpha$ -actinina-3; 2) a análise aguda dos efeitos de provas de ultra-endurance em marcadores bioquímicos (BELLI et al., 2017; DEL COSO et al., 2017a; DEL COSO et al., 2017b) e neuromusculares (DEL COSO et al., 2017a; DEL COSO et al., 2017b) de DM. Os três estudos citados identificaram aumentos significativamente maiores na atividade sérica de proteínas intracelulares e na dor muscular em membros inferiores e diminuições significativamente menores da função muscular em indivíduos carregadores do alelo polimórfico X após eventos de ultra-endurance. Entretanto, uma limitação desses estudos são os pontos de coleta. Como não foram investigadas alterações nos marcadores supracitados nos dias seguintes aos eventos danificadores, a fadiga muscular aguda induzida pelas provas pode ser considerada como um fator de confusão. Essa limitação é compreensível considerando a dificuldade em recrutar atletas praticantes desse tipo de competição e, ainda mais, em mantê-los na cidade da competição nos dias subsequentes à mesma para coletas de dados. Mesmo assim, ainda há uma lacuna de conhecimento no que diz respeito às mudanças em marcadores de DM induzidas por corridas de longa distância sem que a fadiga muscular aguda atue como um fator de confusão.

Poucos estudos investigaram a relação entre a susceptibilidade ao DM e o polimorfismo do gene ACTN3. Destes, três mediram apenas marcadores bioquímicos e subjetivos de DM (CLARKSON et al., 2005; VINCENT et al., 2010; PIMENTA et al., 2012), um mediu o desempenho neuromuscular em modelo animal (SETO et al., 2011), um mediu tanto marcadores bioquímicos/subjetivos quanto o desempenho de força (VENCKUNAS et al., 2012) e três mediram apenas o efeito agudo de provas de ultra-endurance em marcadores bioquímicos e de desempenho muscular em atletas de endurance (BELLI et al., 2017; DEL COSO et al., 2017a; DEL COSO et al., 2017b). Dentre os estudos revisados, o que parece ser mais completo é o de Venckunas et al. (2012) pelos seguintes motivos: 1) mediu marcadores de desempenho muscular - considerados os mais fidedignos para a quantificação do DM (DAMAS et al., 2016) - e bioquímicos/subjetivos de DM; 2) utilizou uma população não treinada, evitando um fator de confusão relacionado ao ECR; 3) utilizou um método ecológico de indução de DM (i.e., *drop-jumps*) em contraste com contrações excêntricas máximas isocinéticas ou contrações eletricamente estimuladas. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo divergiram do corpo de conhecimento construído nos quatro estudos prévios a ele. Desta forma, é razoável afirmar que ainda há uma considerável lacuna de conhecimento no que diz respeito à relação entre a susceptibilidade ao DM e o polimorfismo do gene ACTN3. Mais estudos devem ser conduzidos

com população não treinada e em diferentes grupos musculares, uma vez que os extensores do joelho, grupo utilizado por Venckunas et al. (2012) podem, também, apresentar um ECR fenotípico conferido por atividades diárias danificadoras.

### 3 JUSTIFICATIVA

Embora haja um número considerável de estudos que investigam a relação da EC com a força muscular, pouco se sabe a respeito da relação entre a especificidade da medida desta com os índices que determinam a eficiência durante a corrida. Dessa forma, acreditamos que seja importante investigar se protocolos de avaliação de força específicos à corrida (i.e. de cadeia cinética fechada) apresentam relação com a EC. Há, também, uma lacuna de conhecimento no que diz respeito a estratégias de prevenção do acometimento desse importante índice de aptidão aeróbia após atividades que induzem DM. A investigação desses tipos de estratégias, já consolidadas no que diz respeito à proteção contra o DM, pode ser importante para prevenir situações de queda de desempenho de atletas durante provas de longa duração, assim como promover menor desconforto e aumento da qualidade de vida para entusiastas da prática de atividade física, além de viabilizar a manipulação de diferentes mecanismos relacionados ao sistema neuromuscular que são determinantes para a EC. Por fim, consideramos importante a identificação de fatores genéticos na resposta ao dano muscular e, principalmente, alterações na EC induzidas por este. Frente a evidências recentes da relação de polimorfismos genéticos do gene ACTN3 com este importante marcador de desempenho aeróbio e, conscientes da relação destes polimorfismos com a susceptibilidade ao DM, acreditamos que seja possível, por meio desse modelo, avançar o conhecimento corrente acerca da relação existente entre força muscular e EC

## 4 OBJETIVO

### 4.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi analisar a relação entre força máxima e explosiva e a EC utilizando o modelo de DM induzido pela CrED.

### 4.2 Objetivos específicos

- Analisar se a especificidade do método de avaliação de força muscular (força isométrica dos extensores do joelho *vs.* força no salto vertical) e a forma pela qual ela se manifesta (i.e., força máxima *vs.* força explosiva) influenciam a magnitude das alterações e a cinética da recuperação neuromuscular quando comparadas às da EC, após a indução do DM por meio de um protocolo de CrED.

- Analisar a influência do EP conferido por 10 CIM sobre a magnitude e a cinética de recuperação neuromuscular e, principalmente, da EC, após a indução do DM por meio de um protocolo de CrED.

- Analisar o efeito da suplementação com um composto antioxidante e anti-inflamatório rico em ANN na magnitude das alterações e na cinética de recuperação neuromuscular e, em especial, da EC, após a indução do DM por meio de um protocolo de CrED.

- Analisar o efeito combinado da realização de 10 CIM e da suplementação com um composto antioxidante e anti-inflamatório rico em ANN na magnitude das alterações e na cinética de recuperação neuromuscular e da EC após a indução do DM por meio de um protocolo de CrED

- Verificar a influência do polimorfismo R577X do gene ACTN3 sobre a magnitude das alterações e a cinética de recuperação neuromuscular e da EC, após a indução do DM por meio de um protocolo de CrED.



## 5 HIPÓTESES

As hipóteses testadas no presente estudo foram:

1) A cinética da recuperação da EC após uma sessão de CrED é similar à cinética de recuperação da força muscular, quando esta é avaliada por meio de um teste específico à corrida (saltos com e sem contra-movimento – cadeia cinética fechada), contrastando com dados existentes que demonstram que a força, quando medida por meio de testes inespecíficos à corrida (i.e, contrações isométricas máximas de cadeia cinética aberta), se recupera mais lentamente do que a EC (CHEN et al., 2007).

2) Estratégias já consolidadas de proteção contra o DM, como a suplementação com compostos ricos em flavonoides, a realização prévia de CIM e a somatória destes dois efeitos, seriam úteis, também, na proteção contra a diminuição da EC após um protocolo de CrED.

3) Indivíduos que não produzem a forma funcional da proteína estrutural  $\alpha$ -actinina-3 (genótipo XX) sofrem menor DM e, conseqüentemente, menores diminuições da EC após o mesmo protocolo de CrED.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Voluntários

Participaram do presente estudo 85 indivíduos do sexo masculino, ativos, sem experiência recente com treinamento de força ou resistência ou prática sistematizada de atividade física. Todos os voluntários foram orientados a não praticar atividades físicas intensas durante o protocolo de pesquisa, manter seus hábitos alimentares regulares e ingerir bastante líquido, para evitar a manifestação de rabdomiólise clínica. Todos os sujeitos de pesquisa leram e assinaram dois termos de consentimento livres e esclarecidos (CEP UNESP Rio Claro, CAAE: 33735914.1.0000.5465 e 33740014.1.0000.5465) para a participação no projeto, e puderam retirar o seu consentimento em qualquer momento. Os procedimentos de coleta e interação com os voluntários foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinki, sobre o uso de humanos em projetos de pesquisa.

### 6.2 Delineamento experimental

Todos os voluntários passaram por duas adaptações ao dinamômetro isocinético (Biodex Pro 3 System, Shirley, NY, EUA) e aos saltos realizados sobre a plataforma de força, além de um teste incremental de rampa para a determinação do  $VO_2\text{max}$ . Uma semana depois, eles foram aleatoriamente alocados para um de cinco grupos ( $n = 15$  por grupo): grupo controle (CON); grupo de suplementação (SUP); grupo placebo (PLA); grupo de contrações isométricas (ISO) e grupo combinado (COMB – suplementação + contrações isométricas máximas).

Todos os grupos passaram por um protocolo de 30 minutos de CrED com inclinação de -15% à velocidade correspondente a 70% da velocidade individual em que os participantes atingiram o  $VO_2\text{max}$  durante o teste incremental (Figura 1). Os seguintes marcadores indiretos de DM foram coletados antes, imediatamente depois, 24, 48, 72 e 96 após a CrED: Pico de torque isométrico (PTI); Taxa de desenvolvimento de torque (TDT); Altura de salto e pico de força de reação do solo ( $F_r$ ) de salto com contra movimento e sem contra movimento (*squat jump*). A percepção subjetiva de dor (PSD), amplitude de movimento do joelho e circunferência da porção medial da coxa foram coletadas nos mesmos momentos que os demais marcadores, com exceção

do momento imediatamente após a CrED. A atividade sérica da creatina quinase (CK) foi coletada antes, 48 e 96 horas após a CrED.

**Figura 1.** Disposição da esteira para a corrida em declive.



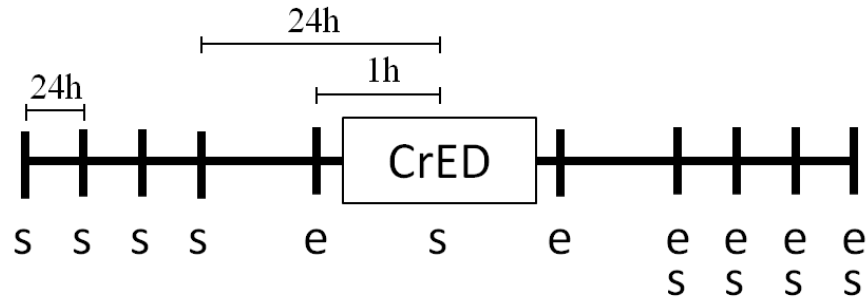
### 6.2.1 Especificidade da avaliação de força

Para investigar a influência da especificidade da avaliação da força muscular nas alterações na EC induzidas pelo DM, os voluntários do grupo CON realizaram testes de força de cadeia cinética aberta e fechada antes e após a CrED. O teste de avaliação de força de cadeia cinética aberta foi realizado por meio de contrações isométricas máximas com 75° de extensão do joelho em um dinamômetro isocinético. Já os testes de avaliação de força de cadeia cinética fechada consistiram de saltos com contra movimento e *squat jumps*. Após a CrED, a magnitude da diminuição e a cinética de recuperação da EC foram comparadas com as mesmas da força muscular, avaliada pelos 3 diferentes testes neuromusculares.

### 6.2.2 Suplementação

O estudo de suplementação com suco rico em ANN foi conduzido em modelo duplo cego, sem que os voluntários de nenhum dos grupos soubessem se estavam ingerindo o placebo ou o composto estudado, assim como examinador que realizou a análise dos dados. Os voluntários do grupo PLA ingeriram 240 ml de um placebo composto por maltodextrina e água duas vezes por dia nos quatro dias anteriores à CrED, assim como no dia da atividade e nos 4 dias seguintes a ela. Já os voluntários do grupo SUP ingeriram o mesmo volume de um suco antioxidante (SA) (Suco Antiox, Juxx, Brasil) rico em compostos fenólicos e antocianinas nos mesmos momentos (Figura 2). O SA consistia de uma mistura de suco de maçã clarificado com poupas concentradas de ameixa, mirtilo, maqui berry, framboesa e cranberry. Cada dose (240 ml) do SA contém cerca de 58 mg de ANN e capacidade antioxidante de 67.680  $\mu\text{mol/ml}$  de trolox equivalente (medido pelo método ORAC5 para identificar a capacidade antioxidante). Há evidência de que a suplementação com alimentos similarmente ricos em compostos fenólicos promove uma atenuação na percepção subjetiva de dor e recuperação acelerada da força muscular após protocolos de indução de DM (CONNOLLY et al., 2006; HOWATSON et al., 2010; McLEAY et al., 2012). O volume diário de consumo do SA no presente estudo, assim como o intervalo de suplementação pré e pós CrED foram estipulados baseados em estudos que demonstraram a eficiência da suplementação com compostos antioxidantes similares na prevenção e recuperação de índices de DM (CONNOLLY et al., 2006; TRAUSTADÓTTIR et al., 2009; HOWATSON et al., 2010; BOWTELL et al., 2011). O grupo CON passou pelo mesmo protocolo de CrED sem a ingestão do SA ou de placebo. A quantidade de calorias era idêntica entre o SA e o PLA.

**Figura 2.** Delineamento experimental do estudo de suplementação



**CrED:** corrida em declive; **s:** momentos em que os voluntários consumirão o suplemento ou o placebo; **e:** momentos de avaliação de economia de corrida e marcadores de dano muscular.

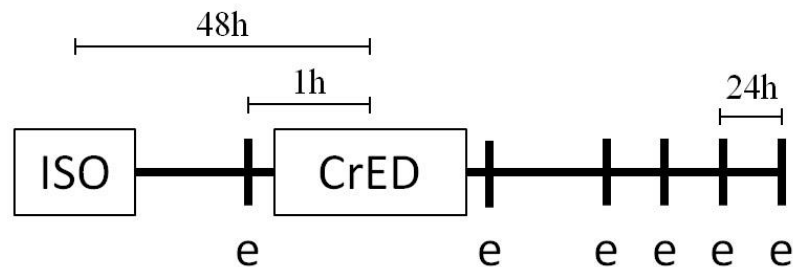
### 6.2.3 Contrações isométricas

Os voluntários do grupo ISO realizaram 10 CIM dois dias antes da realização da CrED. As CIM foram realizadas em um aparelho de musculação *Leg Press* com inclinação de 45° (Figura 3). Este tipo de exercício foi escolhido pelo fato das contrações nele executadas terem como característica a cadeia cinética fechada, um tipo de contração específico à corrida, seja ela em plano ou em declive (ASSUMPCÃO et al., 2013). Cada CIM teve duração de 3 segundos e foram respeitados 45 segundos de intervalo entre cada contração, como proposto por CHEN et al. (2012a). Para garantir que o músculo do quadríceps se contraísse em uma posição alongada, a altura do assento do aparelho foi manipulada até que o joelho dos voluntários estivesse em uma angulação entre 100 e 110° (considerando a extensão completa como 0°). O grupo CON não realizou nenhuma atividade de condicionamento prévia à CrED. O delineamento experimental para o estudo das CIM segue ilustrado na Figura 4.

**Figura 3.** Disposição do aparelho de *Leg Press* durante a realização das contrações isométricas máximas para os grupos ISO e COMB.



**Figura 4.** Delineamento experimental do estudo de contrações isométricas máximas.



**CrED:** corrida em declive; **ISO:** contrações isométricas máximas; **e:** momentos de coleta de economia de corrida e marcadores de dano muscular.

#### 6.2.4 Suplementação com suco antioxidante e realização de contrações isométricas máximas

Com o intuito de investigar potenciais efeitos aditivos na proteção contra o DM conferidos pela suplementação com SA e a realização de CIM, os voluntários do grupo COMB passaram por ambas as intervenções simultaneamente. Para tanto, esses voluntários passaram por

um protocolo de suplementação com SA idêntico àquele descrito no item 6.2.2., além de realizarem 10 CIM dois dias antes da CrED, como descrito no item 6.2.3.

#### 6.2.5 Polimorfismo do gene ACTN3

Para a investigação da influência dos polimorfismos genéticos do gene ACTN3 na susceptibilidade ao DM e conseqüente diminuição da EC, foi criado um cadastro de voluntários que passaram por genotipagem para a determinação dos diferentes polimorfismos desse gene. Os voluntários foram, então, divididos em dois diferentes grupos de acordo com os polimorfismos do gene ACTN3. Os indivíduos que apresentaram exclusivamente a forma truncada da  $\alpha$ -actinina-3 (genótipo XX) foram alocados para o grupo XX (n = 10) e os que possuíam a forma funcional dessa proteína (genótipo RR) foram alocados para o grupo RR (n = 10). Os dois grupos passaram pelo mesmo protocolo de CrED descrito acima e foram investigadas diferenças na EC na condição basal entre os grupos, além de dissociações na magnitude e cinética de recuperação deste índice e de marcadores indiretos de DM.

### 6.3 Genotipagem do polimorfismo R577 do gene ACTN3

Para a extração sanguínea, foi realizada punção venosa utilizando o sistema vacutainer com EDTA, com o qual foram coletados 4 ml de sangue dos voluntários por um profissional de saúde devidamente treinado e autorizado a realizar tal procedimento. A extração do DNA genômico do sangue foi realizada por meio do método de *salting out*. Para tanto, o sangue total era transferido para um tubo estéril de 50 ml, ao qual era adicionado um tampão de lise (0,3 M de sacarose, 10 mM de Tris-HCl a um pH de 7,5, 5 mM de MgCl e 1% de Triton). A amostra era, então, homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 3300 rpm a uma temperatura de 4° C. Após este processo, o sobrenadante era descartado e o *pellet* misturado a outro tampão (0,075 M NaCl, 0,024 M EDTA), 125  $\mu$ L de sulfato de duodecil, e 1 ml de perclorato de sódio e agitado vigorosamente por 10 segundos.

Eram, então, adicionados 2 ml de NaCl 6 M à amostra e novamente agitados, por 15 segundos. Após esta etapa, a amostra era novamente centrifugada por 8 minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente (25° C). Após a centrifugação o sobrenadante era transferido

cuidadosamente para outro tubo estéril de 50 ml e o *pellet* descartado. Eram adicionados, então, 7 ml de isopropanol absoluto ao sobrenatante, e misturados delicadamente até que ocorresse a precipitação do DNA genômico. Depois de precipitado, o DNA era cuidadosamente removido do tubo e transferido para um eppendorf estéril. A amostra de DNA era lavada duas vezes com etanol 70% e, em seguida, o eppendorf era invertido sobre papel de filtro até que todo o etanol evaporasse (aproximadamente 40 minutos). Após a evaporação total do etanol, eram adicionados 50 µl de H<sub>2</sub>O estéril no eppendorf contendo o DNA genômico. Após a dissolução completa do DNA na H<sub>2</sub>O estéril, as amostras eram armazenadas a -20° C até o momento da análise.

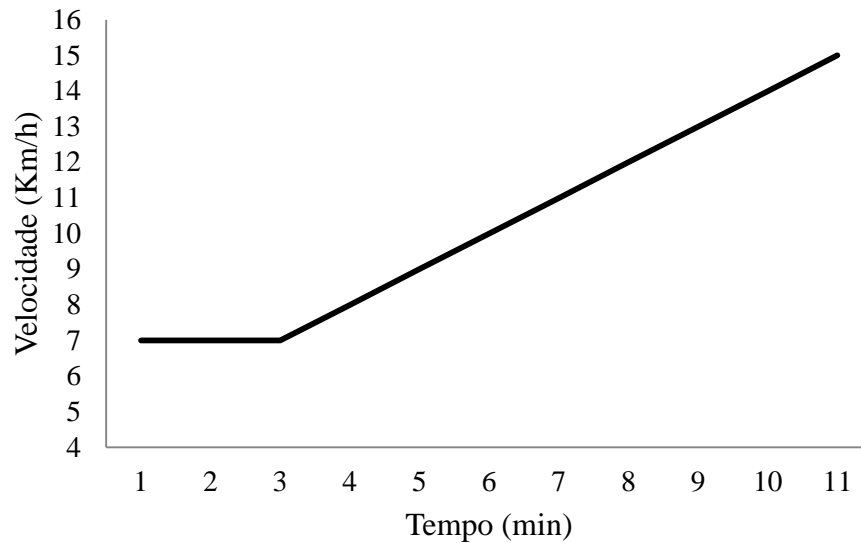
A determinação dos polimorfismos do gene ACTN3 foi realizada pelo método de reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real. Para tanto, aproximadamente 100 ng de DNA genômico foram utilizados como molde. Foram utilizadas sondas Vic-CTGACCGAGAGCGA e Fam-AGGCTGACTGAGAGC (Applied Biosystems, EUA) para a demarcação dos alelos R e X, respectivamente. A discriminação dos alelos foi realizada por um sistema de detecção de sequências genômicas (Sequence Detection System 7000, Applied Biosystems, EUA), utilizando um mix específico para PCR (TaqMan PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA). O protocolo de ciclos térmicos consistiu de um ciclo inicial de 10 minutos a 95° C, seguido de 40 ciclos seguidos de 15 segundos a 94° C, seguidos por 60 segundos a 60° C. Após os ciclos, o equipamento determinava, a partir da fluorescência emitida pelas sondas ancoradas no DNA genômico, o polimorfismo R577 do gene ACTN3.

#### **6.4 Determinação do VO<sub>2</sub>max da intensidade em que ele é atingido**

O VO<sub>2</sub>max dos participantes foi medido por meio de um teste incremental de esteira (Pulsar, h/p/ cosmos, Nussdorf Traunstein, Alemanha) em que os indivíduos corriam com 1% de inclinação até a exaustão voluntária. No início do teste, os voluntários corriam por 3 minutos a uma velocidade constante de 7 km/h, como forma de aquecimento. A partir do quarto minuto, eram administrados incrementos de 1 km/h por minuto de forma gradual, ou seja, a velocidade da esteira aumentava em 0,016 km/h a cada segundo (Figura 5). O teste era encerrado quando o voluntário não conseguisse mais sustentar a corrida.



**Figura 5.** Protocolo do teste incremental de rampa, utilizado para a determinação do consumo máximo de oxigênio. Os incrementos na velocidade continuam até a exaustão voluntária.



Durante os testes incrementais, os voluntários vestiram uma máscara acoplada a um analisador de gases (Quark PFT Ergo, Cosmed, Itália) que coletava o volume de oxigênio ( $VO_2$ ), volume de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ), o QR ( $VCO_2/VO_2$ ) e a ventilação (VE) respiração por respiração. O  $VO_{2max}$  foi considerado como o maior valor de  $VO_2$  obtido durante o teste, após a filtragem (média de 15 em 15 segundos dos valores obtidos) dos dados. A intensidade do  $VO_{2max}$  foi considerada como a velocidade em que o  $VO_{2max}$  era atingido.

### 6.5 Economia de corrida

Para a quantificação da EC, os voluntários realizavam um teste de cinco minutos de corrida em esteira à velocidade referente a 80%  $VO_{2max}$ . A escolha dessa intensidade se baseia nos achados de Chen et al. (2009), que demonstram que o DM induzido por sessões de CrED compromete a EC quando avaliada em intensidades próximas a essa faixa (~ 80 a 90% da  $VO_{2max}$ ), mas não quando ela é medida a 70% da  $VO_{2max}$ .

Durante o teste de EC, as trocas gasosas dos voluntários eram medidas continuamente. Foram calculadas as médias dos valores de  $VO_2$ , QR e VE obtidos no último minuto dos testes e utilizados como marcadores da EC. A adoção do último minuto de testes para análises dos

marcadores de EC é justificada pela estabilização desses marcadores nesse período, como demonstrado na Figura 6, visando evitar, portanto, possíveis interferências do componente lento do  $\text{VO}_2$  nas medidas de EC.

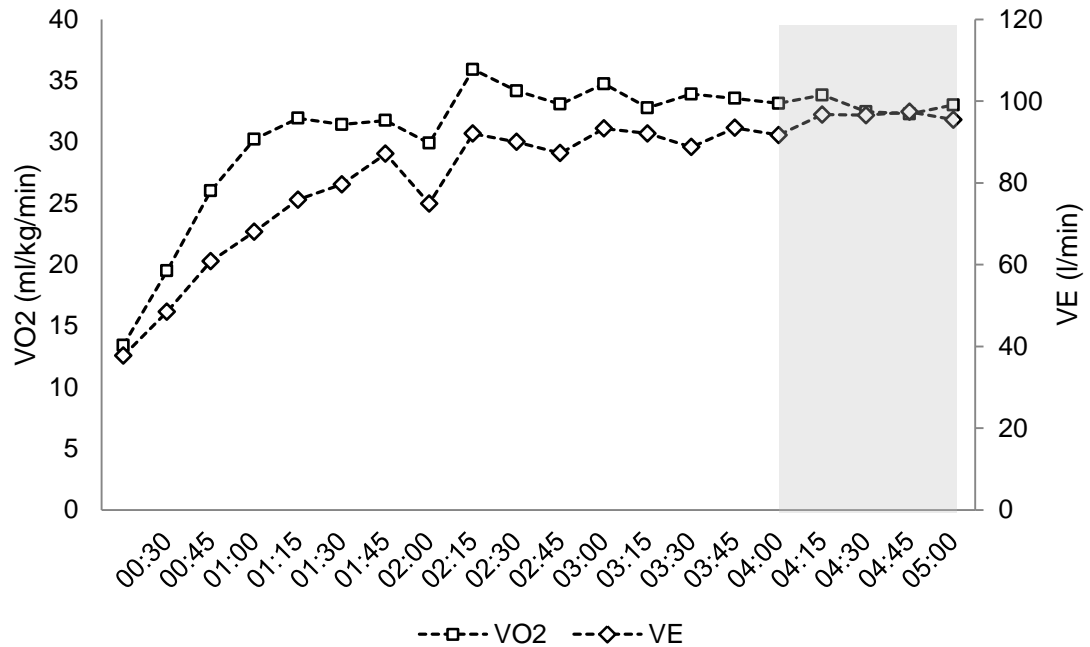
O último minuto dos testes de EC também era filmado por uma câmera comercial (Compact Full HD Memory Camcorder, Samsung, Coréia do Sul) com frequência de captura de 60 Hz, posicionada a 3 metros de distância da esteira, no plano sagital. Por meio das filmagens, era calculada a frequência de passada dos voluntários por meio da contagem do número de passadas realizadas ao longo de um minuto, com o uso de um software de processamento de vídeos (VirtualDub). Conhecidas a frequência de passadas e a velocidade constante da corrida, calculou-se a amplitude de passada por meio da seguinte equação:

$$AP = \frac{\left[\left(\frac{V}{3,6}\right) \cdot 60\right]}{FP} \quad (1)$$

na qual AP é a amplitude de passada, V é a velocidade da corrida durante o teste de EC ( $\text{km.h}^{-1}$ ), e FP é a frequência de passada ( $\text{passadas.min}^{-1}$ ). Os dados de amplitude e frequência de passada estão expressos em  $\text{m.passada}^{-1}$  e  $\text{passos.s}^{-1}$ .

Ao final de todos os testes de EC, foram avaliadas a percepção subjetiva de esforço (PSE) e concentração sanguínea de lactato ([La]). A PSE era informada pelos voluntários, utilizando uma escala de análogos visuais que varia de 6 a 20. Para a determinação da [La], 25  $\mu\text{l}$  de sangue eram extraídos do lóbulo da orelha dos voluntários e analisados por um método eletroquímico em um lactímetro profissional (YSL 2300 STAT, Yellow Springs, EUA). Os valores de PSE e [La] também foram considerados como marcadores de EC.

**Figura 6.** Gráfico representando a estabilização dos marcadores respiratórios de EC ao longo dos cinco minutos de corrida.



O trecho sombreado representa o intervalo de teste utilizado para análises. VO2: volume de oxigênio; VE: ventilação.

## 6.6 Marcadores indiretos de dano muscular

Foram considerados como marcadores indiretos de DM o pico de torque isométrico (PTI), taxa de desenvolvimento de torque (TDT), percepção subjetiva de dor (PSD), atividade sérica da enzima creatina quinase (CK), amplitude de movimento do joelho, circunferência da porção medial da coxa e a força de reação do solo ( $F_r$ ) e altura (AS) de saltos verticais com contra movimento e *squat jumps*.

### 6.6.1 Pico de torque isométrico e taxa de desenvolvimento de torque

Para a determinação do PTI e da TDT dos extensores do joelho, os voluntários realizavam duas contrações isométricas máximas no dinamômetro isocinético com 180 segundos de intervalo entre si. O dinamômetro foi acoplado a um módulo de aquisição de sinais biológicos com

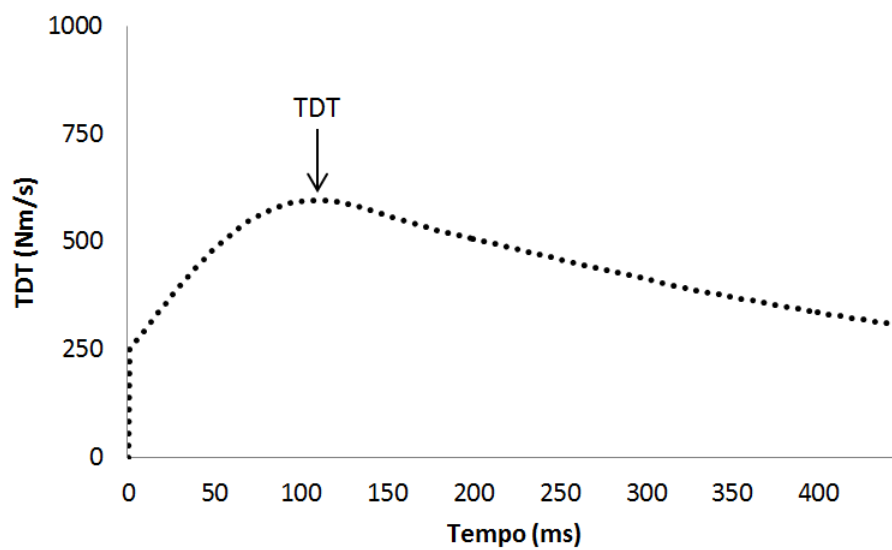
frequência de captura de 1000 Hz (Miotoool 200/400, Miotec, Brasil) durante todas as coletas. Os voluntários eram posicionados no aparelho de acordo com as recomendações do fabricante, com a articulação do joelho flexionada em  $75^{\circ}$ , devidamente fixados, e eram instruídos a exercer o máximo de força possível contra a alavanca do aparelho da maneira mais rápida possível (SAHALY et al., 2001) (Figura 7). A correção gravitacional da força aplicado pela massa dos membros inferiores dos voluntários era realizada previamente a todas as contrações isométricas máximas.

A contração de maior PTI foi utilizada para análises de PTI e TDT. Para a análise do PTI e da TDT, foi aplicado um filtro Butterworth de 4<sup>a</sup> ordem, passa baixa e uma frequência de corte de 15 Hz em ambiente MatLab (MatLab 6.5, Mathworks, EUA). O PTI foi considerado como o maior valor de torque produzido durante as contrações. Para a determinação da TDT, o início de cada contração foi considerado como o primeiro momento em que o torque produzido fosse maior do que 2,5% da diferença entre a linha de base da contração e o PTI. A TDT foi considerada como o maior valor da inclinação da curva momento-tempo, obtida pelo cálculo da razão entre a variação de torque e a variação de tempo ( $\Delta\text{torque}/\Delta\text{tempo}$ ) em intervalos de 0 a n (0-1, 0-2, 0-3, 0-n) (AAGAARD et al., 2002) (Figura 8).

**Figura 7.** Posicionamento dos voluntários durante a execução das contrações isométricas máximas no dinamômetro isocinético.



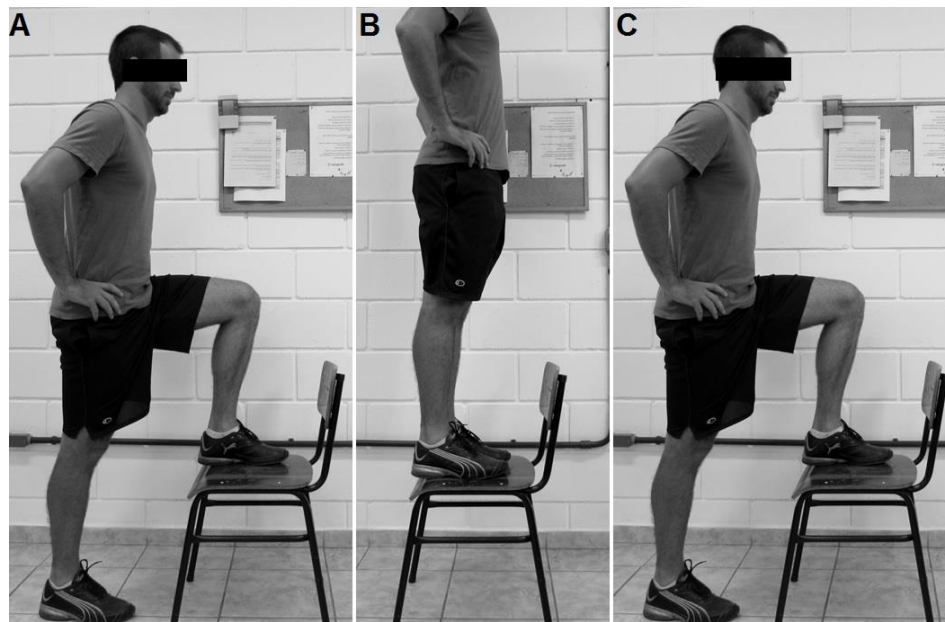
**Figura 8.** Ilustração de uma curva de taxa de desenvolvimento de torque (TDT) em função do tempo com sinalização do valor utilizado para análise.



### 6.6.2 Percepção subjetiva de dor

A PSD foi mensurada a partir de uma escala de análogos visuais de 100 mm com os dizeres “sem dor” em uma extremidade e “muita, muita dor” na outra (LIMA & DENADAI, 2011). Os voluntários eram instruídos a subir e descer de uma cadeira de 45 cm de altura utilizando apenas o membro dominante em ambas as fases e sem o auxílio das mãos (LEOPARDI, 2014) (Figura 9). Em seguida, preenchiem uma escala de dor de acordo com o nível de dor muscular sentida nos músculos extensores do quadril, extensores do joelho e flexores plantares durante a realização da tarefa. A escolha desses músculos foi feita baseada nos principais músculos utilizados durante a corrida e, também, afetados pelo DM após a CrED, como relatado em estudo piloto. A soma dos valores de dor reportados pelos voluntários nesses três grupos musculares foi utilizada para análise.

**Figura 9.** Teste de step para a determinação da percepção subjetiva de dor



Partindo da posição A, os voluntários sobem na cadeira (B) e, sem seguida, retornam ao estado inicial, se apoiando na mesma perna e controlando a descida (C).

### 6.6.3 Atividade sérica da enzima creatina quinase

Para a determinação da atividade sérica da CK, eram extraídos 500 µl de sangue do lóbulo da orelha dos voluntários. Para que esse volume de sangue fosse coletado sem a ocorrência de hemólise (que pode prejudicar a leitura da amostra), uma pomada vasodilatadora (Finalgon, Pharma GmbH & Co. KG, Alemanha) era aplicada no lóbulo da orelha dos voluntários. Após cinco minutos da aplicação, a pomada era removida, o local limpo com álcool e, em seguida, perfurado com uma lanceta. Após a coleta, o sangue era centrifugado por 10 minutos a 5600 rpm (Microhemato Modelo 2410, Fanem, São Paulo, Brasil). Depois da centrifugação do sangue, o soro era separado do plasma e analisado em um espectrofotômetro (Bio-2000, Bioplus, São Paulo, Brasil) com a utilização de um kit comercial de análise de CK (CK-NAC UV, Wiener Lab., Rosário, Argentina). A faixa de referência dos valores de CK para homens adultos utilizando este método varia entre 24 e 195 U/l.

### 6.6.4 Amplitude de movimento ativo do joelho

A amplitude de movimento do joelho foi calculada subtraindo-se o valor de extensão máxima do joelho do valor de flexão máxima do joelho. Ambos eram coletados por meio de um goniômetro plástico, com os voluntários em decúbito lateral. Para a determinação da extensão máxima do joelho, os voluntários foram instruídos a estender o joelho o máximo possível enquanto, para a flexão máxima do joelho, foram orientados a flexionar a articulação até o máximo. As coletas dessa variável foram realizadas sempre pelo mesmo pesquisador para que a reprodutibilidade fosse assegurada.

### 6.6.5 Circunferência da porção medial da coxa

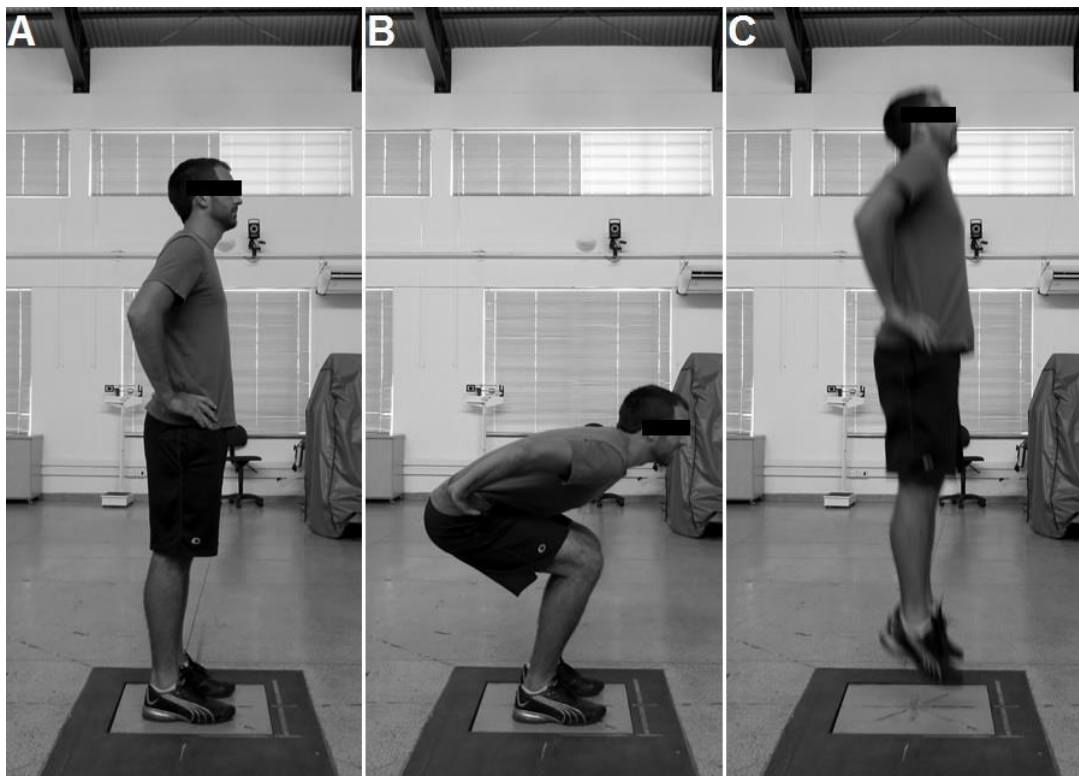
Os valores de circunferência foram medidos na porção medial da coxa dos voluntários. Este ponto anatômico foi calculado como 50% da distância entre o trocânter maior do fêmur e o côndilo lateral do mesmo. Calculada a porção medial da coxa, eram realizadas três medições da circunferência desse ponto, e a média das três foi utilizada para análise. Assim como para a

amplitude de movimento, todas as medidas de circunferência foram realizadas pelo mesmo avaliador.

#### 6.6.6 Saltos com contra movimento e *squat jumps*

Um dos protocolos de avaliação de força foi realizado por meio de análise de saltos verticais com contra movimento e *squat jumps*. Para a realização do salto com contra movimento, os voluntários foram instruídos a saltar o mais alto possível e a aterrissar no mesmo local, partindo de uma posição estática, com os pés paralelos posicionados sobre uma plataforma de força (OR6-6, AMTI, Watertown, EUA) com frequência de amostragem de 2000 Hz, utilizando o contra movimento, ou seja, flexionando o quadril, joelho e tornozelos até uma amplitude auto-selecionada antes do salto para utilizar o ciclo alongamento-encurtamento dos músculos dos membros inferiores (MARIÁN et al., 2016) (Figura 10).

**Figura 10.** Execução do salto com contra movimento.



O voluntário inicia o salto em pé, com as mãos no quadril (A) e, ao sinal do examinador, realiza o contra movimento agachando (B) e, imediatamente depois, salta o mais alto que conseguir (C).



Já para o *squat jump*, os voluntários partiam de uma posição estática, com os pés paralelos e posicionados sobre a plataforma de força e com o quadril, joelho e tornozelo flexionados. Para tanto, a angulação inicial do joelho deveria ser de aproximadamente 90° de flexão, embora esse valor exato não tenha sido medido pelos avaliadores. Após 3 segundos nessa posição, os voluntários eram instruídos a saltar o mais alto possível e aterrissar sobre a plataforma de força (MARIÁN et al., 2016) (Figura 11).

**Figura 11.** Execução do *squat jump*.



O voluntário inicia o salto agachado, com o joelho flexionado em aproximadamente 70° e as mãos no quadril (A) e, ao sinal do examinador, salta o mais alto que conseguir (B).

Os dados obtidos durante os saltos foram processados por meio de rotina em software específico (NEXUS, Vicon, Estados Unidos) e analisados, também, por meio de rotinas específicas desenvolvidas em ambiente Matlab (Matlab 6.0, Mathworks, Estados Unidos). Foi aplicado o filtro de passa baixa Butterworth, com frequência de corte de 15 Hz e as forças de reação do solo foram normalizadas pelo peso corporal de cada voluntário (SACCO et al., 2006). A  $F_r$  foi considerada como o maior valor da força de reação do solo obtido durante a fase de

impulsão dos saltos. A AS foi calculada baseada no tempo de voo dos voluntários, aplicando-se a equação:

$$AS = \frac{(t/2)^2}{2} \cdot g \quad (2)$$

onde t é o tempo de voo (em segundos) e g é a aceleração da gravidade ( $9,81 \text{ m.s}^2$ ) (DIAS et al., 2011).

## 7 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A existência da normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os pressupostos de esfericidade e homogeneidade da amostra foram testados, e confirmados, por meio dos testes de Mauchly e Levene, respectivamente. Os dados obtidos foram comparados ao longo do tempo e entre grupos por meio de ANOVA fatoriais para medidas repetidas (tempo) e não repetidas (grupo). Quando identificados efeitos significantes de tempo e/ou grupo, foram aplicados *post hoc*s de Bonferroni para a identificação de diferenças globais entre grupos ou tempos. Quando identificados efeitos significantes de interação grupo *vs* tempo, foram realizadas ANOVA *One-Way* para medidas repetidas (tempo) e não repetidas (grupo) com a finalidade de identificar diferenças temporais e entre grupos. Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos no software *Statistical Package for Social Sciences 17* (SPSS, IBM, EUA) a partir dos dados absolutos. O nível de significância adotado no presente estudo foi de  $p < 0,01$ . Os dados seguem expressos em tabelas como média  $\pm$  desvio padrão e nas figuras como percentuais dos valores pré CrED.

## 8 RESULTADOS

As médias de idade, massa, estatura, índice de massa corpórea, consumo máximo de oxigênio, velocidade atingida durante o consumo máximo de oxigênio, velocidade da corrida em declive, velocidade dos testes de EC e angulação do joelho durante as contrações isométricas máximas foram comparadas entre os grupos por meio de ANOVAs *One-way* para medidas não repetidas. Não foram identificadas diferenças significantes entre os valores basais das variáveis acima descritas entre nenhum dos grupos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios  $\pm$  desvio-padrão das características dos voluntários e dos dados obtidos durante o teste incremental para os grupos controle (CON), placebo (PLA), suplementação (SUP), isométrico (ISO) e combinado (COMB).

	CON	PLA	SUP	ISO	COMB
	(n=15)	(n=15)	(n=15)	(n=15)	(n=15)
Idade (anos)	23,4 (2,4)	22,8 (2,8)	21,9 (2,3)	22,3 (2,1)	21,1 (2,2)
Massa (kg)	79,2 (7,1)	79,5 (11,8)	74,6 (8,7)	77,9 (10,6)	78,8 (8,8)
Estatura (m)	1,77 (0,05)	1,74 (0,07)	1,77 (0,06)	1,78 (0,05)	1,79 (0,05)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,3 (2)	26,2 (3,2)	23,7 (2,2)	24,6 (2,3)	24,5 (1,9)
VO <sub>2</sub> max (ml/kg/min)	42,5 (4,1)	41,8 (5,7)	43,7 (4,3)	43,7 (3,1)	43,7 (4)
VVO <sub>2</sub> max (km/h)	14 (0,8)	13,9 (1,4)	14,7 (1,2)	14,6 (1)	14,2 (0,9)
V <sub>Declive</sub> (km/h)	9,8 (0,6)	9,7 (1)	10,3 (0,9)	10,2 (0,7)	10 (0,6)
V <sub>EC</sub> (km/h)	10,2 (0,8)	10,1 (1,2)	10,5 (1)	10,3 (1)	10,3 (0,7)
Ang <sub>ISO</sub> (°)	-	-	-	99,9 (2,1)	99,8 (1,6)

IMC: índice de massa corpórea; VO<sub>2</sub>max: consumo máximo de oxigênio; VVO<sub>2</sub>max: Velocidade em que o consumo máximo de oxigênio foi atingido; V<sub>Declive</sub>: Velocidade da corrida em declive; V<sub>EC</sub>: Velocidade do teste de economia de corrida; Ang<sub>ISO</sub>: Angulação do joelho durante as contrações isométricas máximas.

## 8.1 Economia de corrida

A Tabela 2 apresenta os valores de marcadores de EC obtidos antes da realização da CrED. Alterações nos marcadores metabólicos de EC ( $VO_2$ , VE, QR e concentração sanguínea de lactato (Lac)) seguem expressas na Figura 12. Foram identificados efeitos significantes do tempo ( $p < 0,01$ ) para todas as variáveis metabólicas de EC medidas no presente estudo ( $VO_2$ :  $F = 269,4$ ; VE:  $F = 181,1$ ; QR:  $F = 12,6$ ; Lac:  $F = 57,3$ ). Também foi identificado efeito significativo ( $p < 0,01$ ) de interação grupo vs tempo para o  $VO_2$  ( $F = 13,2$ ), VE ( $F = 2,9$ ) e Lac ( $F = 4,1$ ). Não foram identificados efeitos significantes de grupos em nenhuma das variáveis metabólicas de EC coletadas. Testes par-a-par revelaram diferenças entre grupos nas cinéticas de recuperação da EC medida por  $VO_2$ , VE e Lac, como demonstrado na Figura 12. Os grupos SUP e COMB apresentaram recuperação mais rápida do  $VO_2$ , VE e Lac quando comparados aos demais grupos.

Foi identificado efeito significativo de interação grupo vs tempo ( $F = 3,66$ ) na percepção subjetiva de esforço (PSE) durante testes de EC no presente estudo. Houve aumento significativo na PSE imediatamente após a CrED para todos os grupos, sendo que esse aumento se manteve até um dia após a mesma para os grupos CON, PLA, ISO e COMB, mas não para o grupo SUP. O grupo CON continuou apresentando valores alterados de PSE dois dias após a CrED (Figura 13). Foram identificados efeitos significantes ( $p < 0,01$ ) do tempo na frequência ( $F = 33,6$ ) e amplitude ( $F = 35,6$ ) de passada no presente estudo. Não foram identificados, entretanto, efeitos significantes de grupo ou interação grupo vs tempo para essas variáveis (Figura 13).

## 8.2 Dano muscular

A Tabela 3 apresenta os valores de marcadores de dano muscular (amplitude de movimento do joelho, circunferência da porção medial da coxa e atividade sérica de CK) obtidos antes da realização da corrida em declive (CrED).

**Tabela 2.** Valores (médias  $\pm$  DP) de marcadores de economia de corrida obtidos antes da corrida em declive.

	CON (n=15)	PLA (n=15)	SUP (n=15)	ISO (n=15)	COMB (n=15)
VO <sub>2</sub> (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	33,4 $\pm$ 3,5	33 $\pm$ 3,8	35,1 $\pm$ 3,3	34,4 $\pm$ 2,5	35 $\pm$ 2,4
VE (l.min <sup>-1</sup> )	85,5 $\pm$ 7,2	82,9 $\pm$ 7,6	87,9 $\pm$ 14,2	86 $\pm$ 7,8	88,3 $\pm$ 10,4
QR	1,02 $\pm$ 0,07	1,04 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,09	1 $\pm$ 0,09
Lac (mmol.l <sup>-1</sup> )	3,6 $\pm$ 0,39	3,57 $\pm$ 0,63	4 $\pm$ 1,15	3,33 $\pm$ 0,39	3,83 $\pm$ 0,64
PSE	11,5 $\pm$ 1,1	11,5 $\pm$ 1,2	12,3 $\pm$ 1,2	12 $\pm$ 1,4	11,8 $\pm$ 1,2
FP (passos.s <sup>-1</sup> )	2,66 $\pm$ 0,1	2,64 $\pm$ 0,2	2,71 $\pm$ 0,1	2,66 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1
AP (m.passada <sup>-1</sup> )	2,13 $\pm$ 0,2	2,12 $\pm$ 0,24	2,14 $\pm$ 0,17	2,16 $\pm$ 0,25	2,14 $\pm$ 0,1

VO<sub>2</sub>: consumo de oxigênio; VE: ventilação; QR: coeficiente de trocas respiratórias; Lac: concentração sanguínea de lactato; PSE: percepção subjetiva de esforço; FP: frequência de passada; AP: amplitude de passada.

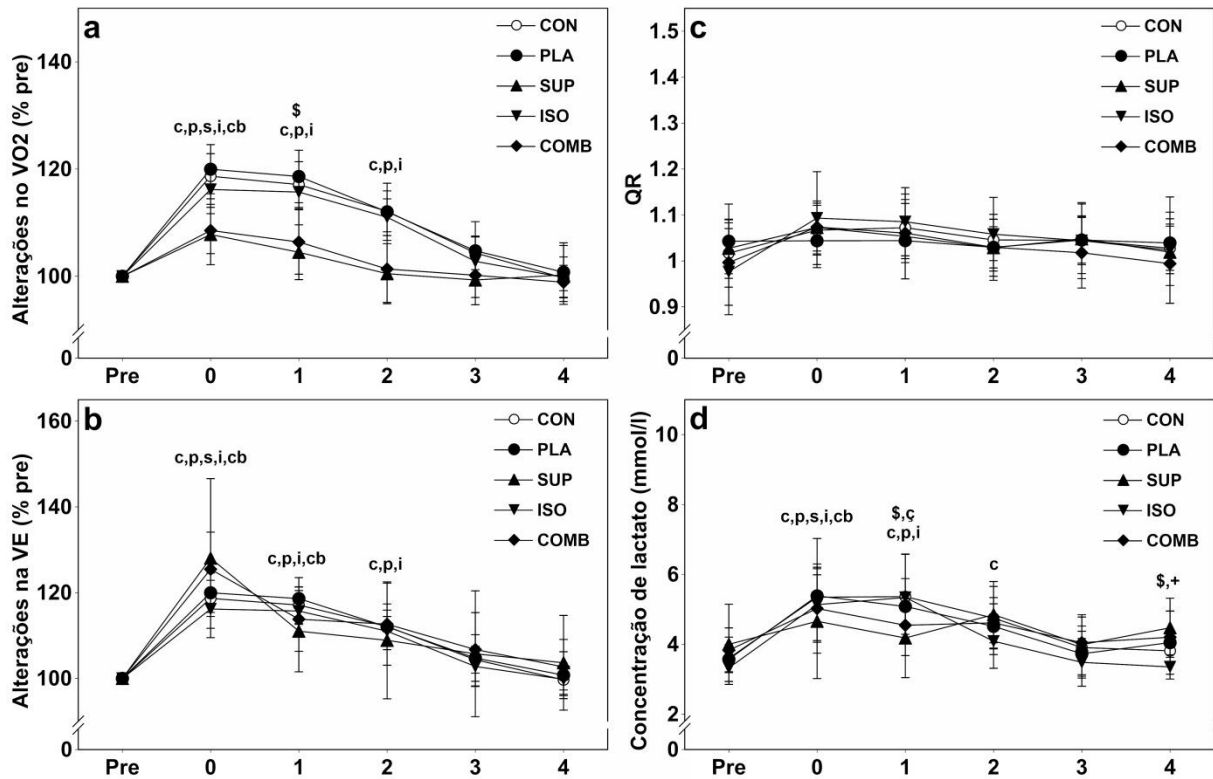
**Tabela 3.** Valores (médias  $\pm$  DP) de marcadores de dano muscular obtidos antes da corrida em declive.

	CON (n=15)	PLA (n=15)	SUP (n=15)	ISO (n=15)	COMB (n=15)
ADM (°)	136,2 $\pm$ 6,5	133 $\pm$ 4,9	137,9 $\pm$ 8,2	133,7 $\pm$ 6	135,7 $\pm$ 5,7
CIR (cm)	55,6 $\pm$ 3,4	56,2 $\pm$ 5,2	52,4 $\pm$ 2,8	53,3 $\pm$ 4,2	54,2 $\pm$ 3,4
CK (U.l <sup>-1</sup> )	124 $\pm$ 47	106 $\pm$ 49	126 $\pm$ 40	94 $\pm$ 43	101 $\pm$ 44

ADM: amplitude de movimento do joelho; CIR: circunferência da porção medial da coxa; CK: atividade sérica da enzima creatina quinase.

Efeitos significantes ( $p < 0,01$ ) do tempo foram identificados em todos os marcadores de DM coletados (percepção subjetiva de dor:  $F = 312$ ; amplitude de movimento:  $F = 72$ ; circunferência da porção medial da coxa:  $F = 74$ ; CK:  $F = 238$ ). Foram identificados efeitos significantes de interação grupo *vs* tempo para percepção subjetiva de dor ( $F = 3,7$ ), circunferência da coxa ( $F = 2,8$ ) e atividade sérica de CK ( $F = 4,9$ ).

**Figura 12.** Alterações em variáveis metabólicas de economia de corrida ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive.

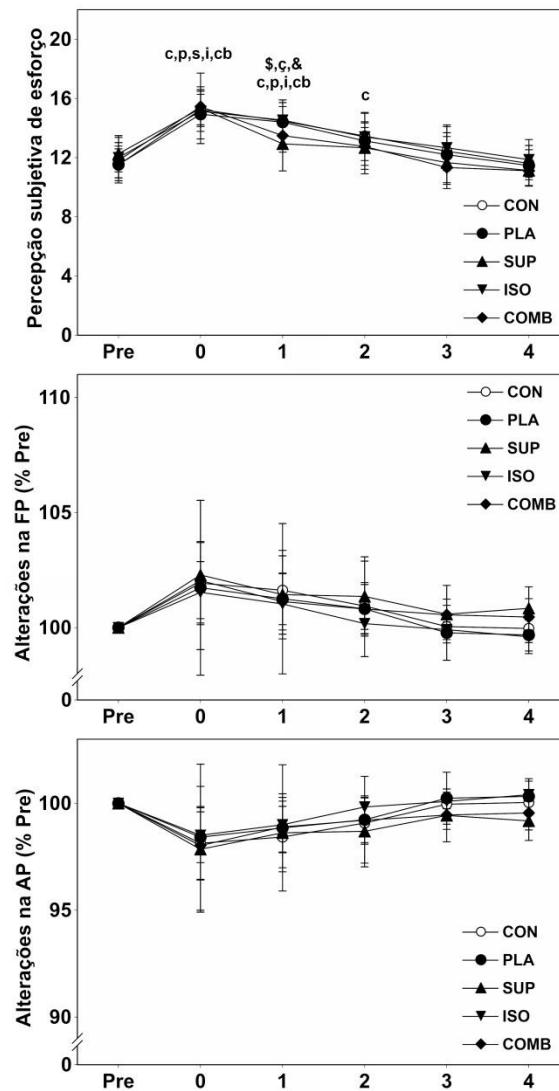


a) VO<sub>2</sub>: consumo de oxigênio; b) VE: ventilação; c) QR: coeficiente de trocas respiratórias; d) concentração de lactato sanguíneo. c:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo CON; p:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo PLA; s:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo SUP; i:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo ISSO; cb:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo COMB; \$:  $p < 0,05$  entre os grupos SUP e ISO; ç:  $p < 0,05$  entre os grupos CON e SUP; +:  $p < 0,05$  entre os grupos ISO e COMB.

Análises par-a-par revelaram aumentos significantes da percepção de dor para todos os grupos imediatamente após a CrED. Os grupos CON, PLA e COMB permaneceram com a percepção de dor alterada até quatro dias após a CrED enquanto os grupos SUP e ISO apresentaram recuperação completa dessa variável no quarto dia após a CrED. A magnitude da percepção de dor foi significante maior para os grupos CON e PLA em relação aos grupos SUP e COMB dois dias após a CrED. Três dias após a CrED a percepção de dor do grupo PLA se manteve significante maior do que as dos grupos SUP e COMB e, quatro dias após a CrED a mesma era maior para o grupo PLA do que para os três grupos experimentais (SUP, ISO e COMB). Análises par-a-par não identificaram alterações significantes na amplitude de movimento ao longo do tempo em nenhum dos grupos após a CrED, nem entre eles. A circunferência da coxa do grupo PLA foi significante maior do que a do grupo SUP três e

quatro dias após a CrED. A atividade sérica de CK aumentou significativamente para todos os grupos 2 dias após a CrED e teve picos 4 dias após a mesma. O grupo CON apresentou atividade sérica de CK significativamente maior do que o grupo ISO dois dias após a CrED. Quatro dias após a CrED, a atividade sérica de CK do grupo CON foi estatisticamente maior do que as dos grupos SUP, ISO e COMB. As alterações nos marcadores de dano muscular seguem representadas graficamente na Figura 14.

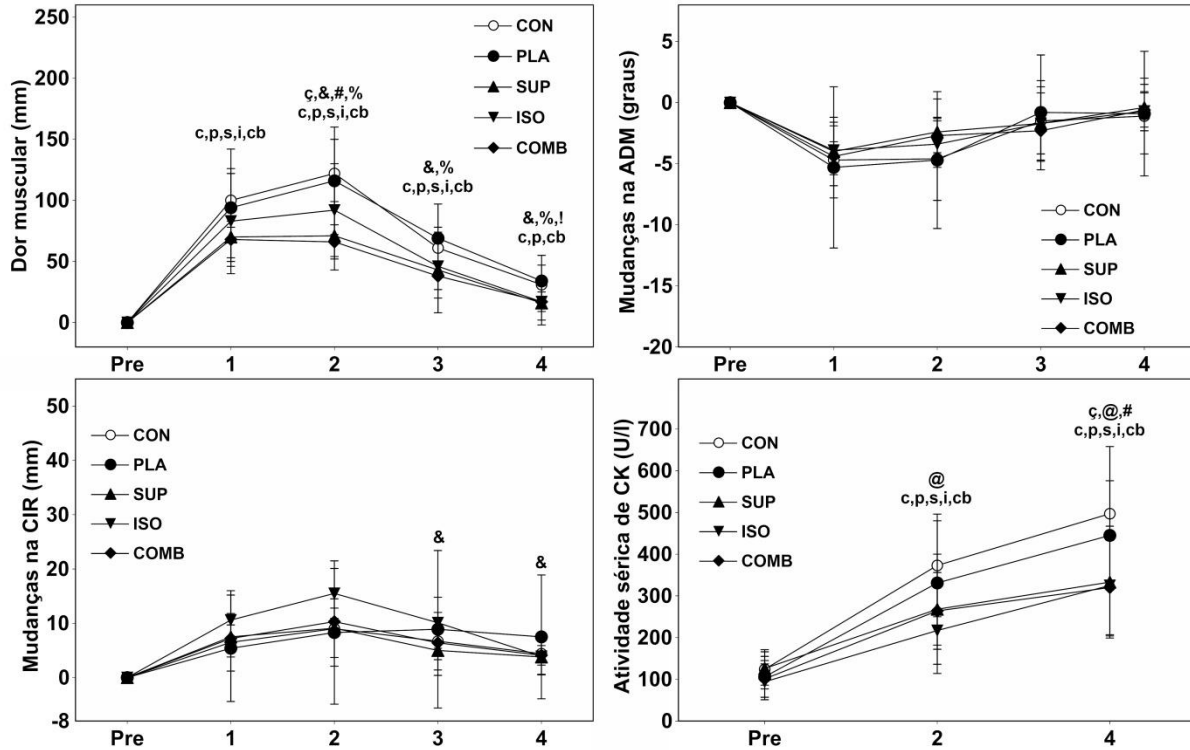
**Figura 13.** Alterações em variáveis perceptuais e biomecânicas de economia de corrida ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive.



a) percepção subjetiva de esforço; b) FP: frequência de passos; c) AP: amplitude de passada. c:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo CON; p:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo PLA; s:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo SUP; i:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo ISSO; cb:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo COMB; \$:  $p < 0,05$  entre os grupos SUP e ISO; ç:  $p < 0,05$  entre os grupos CON e SUP; &:  $p < 0,05$  entre os grupos PLA e SUP.



**Figura 14.** Alterações em marcadores de dano muscular ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive.



a) dor muscular; b) CIR: circunferência da porção medial da coxa; c) ADM: amplitude de movimento do joelho; d) Atividade sérica da enzima creatina quinase. c:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo CON; p:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo PLA; s:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo SUP; i:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo ISSO; cb:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo COMB; ç:  $p < 0,05$  entre os grupos CON e SUP; &:  $p < 0,05$  entre os grupos PLA e SUP; #:  $p < 0,05$  entre os grupos CON e COMB; %:  $p < 0,05$  entre os grupos PLA e COMB; !:  $p < 0,05$  entre os grupos ISO e PLA; @:  $p < 0,05$  entre os grupos CON e ISO.

### 8.3 Força muscular

As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores relacionados à força muscular (torque e saltos, respectivamente) obtidos antes da CrED. Os dados de torque seguem representados na Figura 15. Foi identificado efeito significativo ( $p < 0,01$ ) do tempo para a taxa de desenvolvimento de torque ( $F = 42$ ). Entretanto, só foi encontrada interação significativa entre grupo e tempo para o pico de torque isométrico ( $F = 3,1$ ). Após análise par-a-par, foi identificado que ambos os grupos que consumiram o suplemento antioxidante apresentaram retorno do torque aos valores basais 48 horas após a corrida em declive, enquanto os grupos CON e PLA não apresentaram recuperação

completa no período analisado no presente estudo. Também pôde ser identificada uma recuperação acelerada do pico de torque no grupo ISO, que voltou a produzir força em níveis estatisticamente similares aos basais três dias após a CrED.

**Tabela 4.** Valores (médias  $\pm$  DP) de variáveis relacionadas ao torque obtidos antes da corrida em declive.

	CON (n=15)	PLA (n=15)	SUP (n=15)	ISO (n=15)	COMB (n=15)
PTI (Nm)	285,8 $\pm$ 26,4	290,1 $\pm$ 33,8	277,9 $\pm$ 35,6	288,4 $\pm$ 31,3	269 $\pm$ 36
TDT (Nm.s <sup>-1</sup> )	771 $\pm$ 132	755 $\pm$ 244	676 $\pm$ 85	779 $\pm$ 204	743 $\pm$ 165

PTI: pico de torque isométrico; TDT: taxa de desenvolvimento de torque.

**Tabela 5.** Valores (medias  $\pm$  DP) de variáveis obtidas a partir de saltos com contra movimento e *squat jumps* antes da corrida em declive.

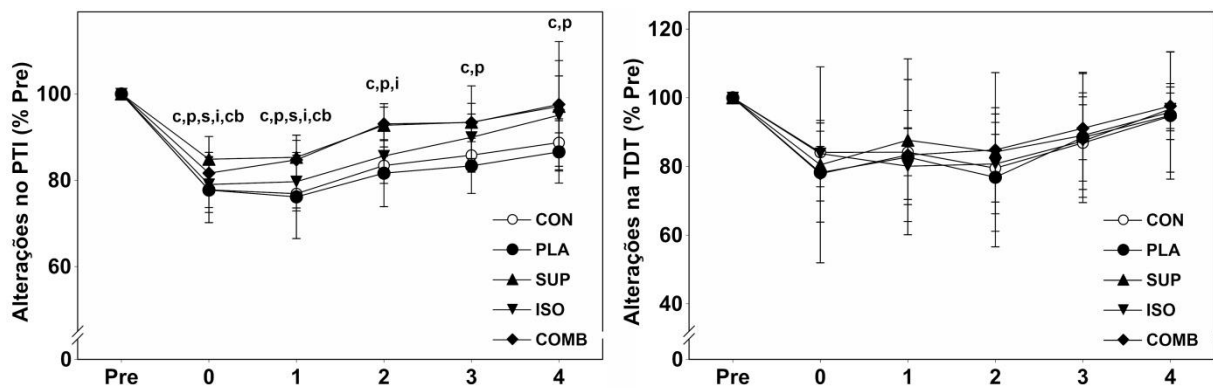
	CON (n=10)	PLA (n=12)	SUP (n=10)	ISO (n=10)	COMB (n=10)
F <sub>r</sub> SCM (N)	1800 $\pm$ 123	1782 $\pm$ 236	1747 $\pm$ 160	1818 $\pm$ 257	1737 $\pm$ 183
AS SCM (m)	0,32 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,02
F <sub>r</sub> SJ (N)	1750 $\pm$ 208	1650 $\pm$ 279	1676 $\pm$ 157	1718 $\pm$ 243	1627 $\pm$ 191
AS SJ (m)	0,30 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,02

F<sub>r</sub> SCM: força máxima de reação do solo durante salto com contra movimento; AS SCM: altura de salto com contra movimento; F<sub>r</sub> SJ: força máxima de reação do solo durante *squat jump*; AS SJ: altura de *squat jump*.

Os dados de força muscular obtidos a partir dos saltos com contra movimento e dos *squat jumps* seguem expressos na Figura 16. Foram identificados efeitos significantes ( $p < 0,01$ ) do tempo tanto para a força máxima de reação do solo (F<sub>r</sub>:  $F = 5,6$ ) quanto para a altura de salto (AS:  $F = 49$ ) dos saltos com contra movimento. Análises *pós hoc* demonstraram que, considerando todos os grupos, a F<sub>r</sub> do salto com contra movimento foi menor do que os valores pré CrED apenas imediatamente após a mesma. Entretanto, a AS de salto com contra movimento foi comprometida, também considerando todos os grupos, até 3 dias após a CrED. O mesmo ocorreu para essas variáveis quando medidas durante *squat jumps* (F<sub>r</sub>:  $F = 3,5$ ; AS:  $F = 46$ ). Não foram identificados efeitos significantes de grupo ou interação grupo *vs* tempo para nenhuma das variáveis medidas durante os dois tipos de saltos realizados no presente estudo.

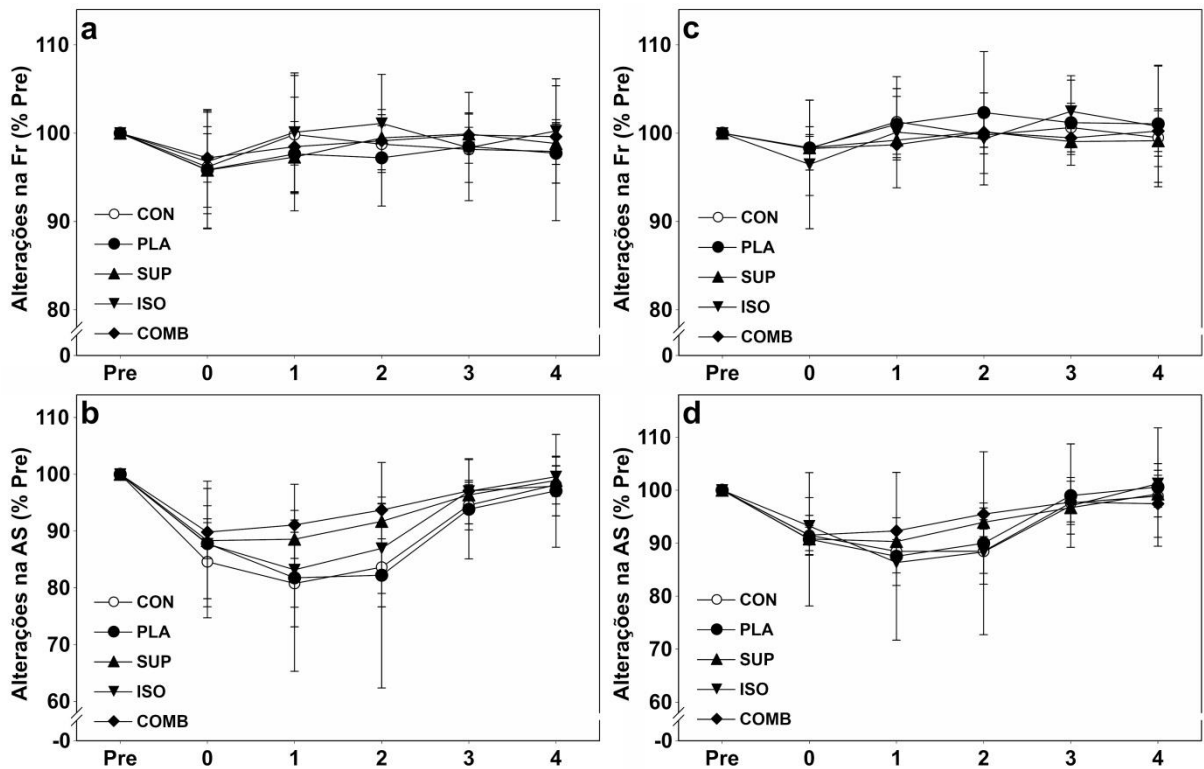
As variáveis de mensuração da força muscular também foram analisadas após normalização pelas massas dos participantes. Esse tipo de análise foi realizado levando em consideração que os valores de  $VO_2$  utilizados como marcadores de EC também são normalizados pela massa dos participantes e, não obstante, por considerar que essa normalização faz sentido, uma vez que a força aplicada pelos músculos dos membros inferiores é utilizada no deslocamento da massa do indivíduo durante a corrida. As análises da força normalizada apresentaram resultados estatísticos similares aos da força não normalizada e, portanto, não serão expressas em gráficos ou tabelas, para evitar a repetição.

**Figura 15.** Alterações no pico de torque isométrico (a) e taxa de desenvolvimento de torque (b) ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive.



c:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo CON; p:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo PLA; s:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo SUP; i:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo ISO; cb:  $p < 0,05$  em relação ao momento pré para o grupo COMB; #:  $p < 0,05$  entre os grupos CON e COMB; %:  $p < 0,05$  entre os grupos PLA e COMB; +:  $p < 0,05$  entre os grupos ISO e COMB.

**Figura 16.** Valores de força máxima de reação do solo e altura de salto durante saltos com contra movimento (a, b) e *squat jumps* (c, d) ao longo do tempo (dias).



#### 8.4 Polimorfismo do gene ACTN3

Para o estudo dos efeitos do polimorfismo do gene ACTN3 nas alterações na EC e em marcadores de DM após a CrED, 20 participantes que não passaram por nenhuma estratégia de prevenção/recuperação do DM foram genotipados e separados em grupos de acordo com os seus polimorfismos do gene ACTN3 (RR: n = 10; XX: n = 10). As Tabelas 6, 7, 8 e 9 apresentam, respectivamente, os valores basais dos marcadores de EC, sintomas de DM, variáveis de torque e variáveis de força produzidas durante saltos dos participantes depois de separados de acordo com seus polimorfismos do gene ACTN3. Não foram identificadas diferenças significantes entre os valores basais de nenhuma das variáveis medidas entre os polimorfismos investigados.

Alterações nos marcadores metabólicos de EC ( $VO_2$ , VE, QR e Lac) seguem expressas na Figura 17. Foram identificados efeitos significantes ( $p < 0,01$ ) do tempo para todos os marcadores metabólicos de EC, com exceção do QR, após a CrED ( $VO_2$ :  $F = 39,4$ ; VE:  $F = 39$ ; Lac:  $F = 15,1$ ). Não foram identificados efeitos significantes de polimorfismo ou interação

polimorfismo *vs* tempo para nenhum desses marcadores. O mesmo foi identificado para os marcadores biomecânicos e de percepção de esforço de EC, como representado na Figura 18 (PSE:  $F_{\text{tempo}} = 73$ ; FP:  $F_{\text{tempo}} = 6,6$ ; AP:  $F_{\text{tempo}} = 7,4$ ).

**Tabela 6.** Valores (médias  $\pm$  DP) de marcadores de economia de corrida obtidos antes da corrida em declive.

	RR (n=10)	XX (n=10)
VO <sub>2</sub> (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	32,3 $\pm$ 4,0	34,2 $\pm$ 2,7
VE (l.min <sup>-1</sup> )	80,8 $\pm$ 12,2	83,7 $\pm$ 8,2
QR	1,05 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,11
Lac (mmol.l <sup>-1</sup> )	3,7 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,8
PSE	11,7 $\pm$ 1,1	11,3 $\pm$ 1,4
FP (passos.s <sup>-1</sup> )	2,61 $\pm$ 0,16	2,68 $\pm$ 0,14
AP (m.passada <sup>-1</sup> )	2,08 $\pm$ 0,24	2,14 $\pm$ 0,17

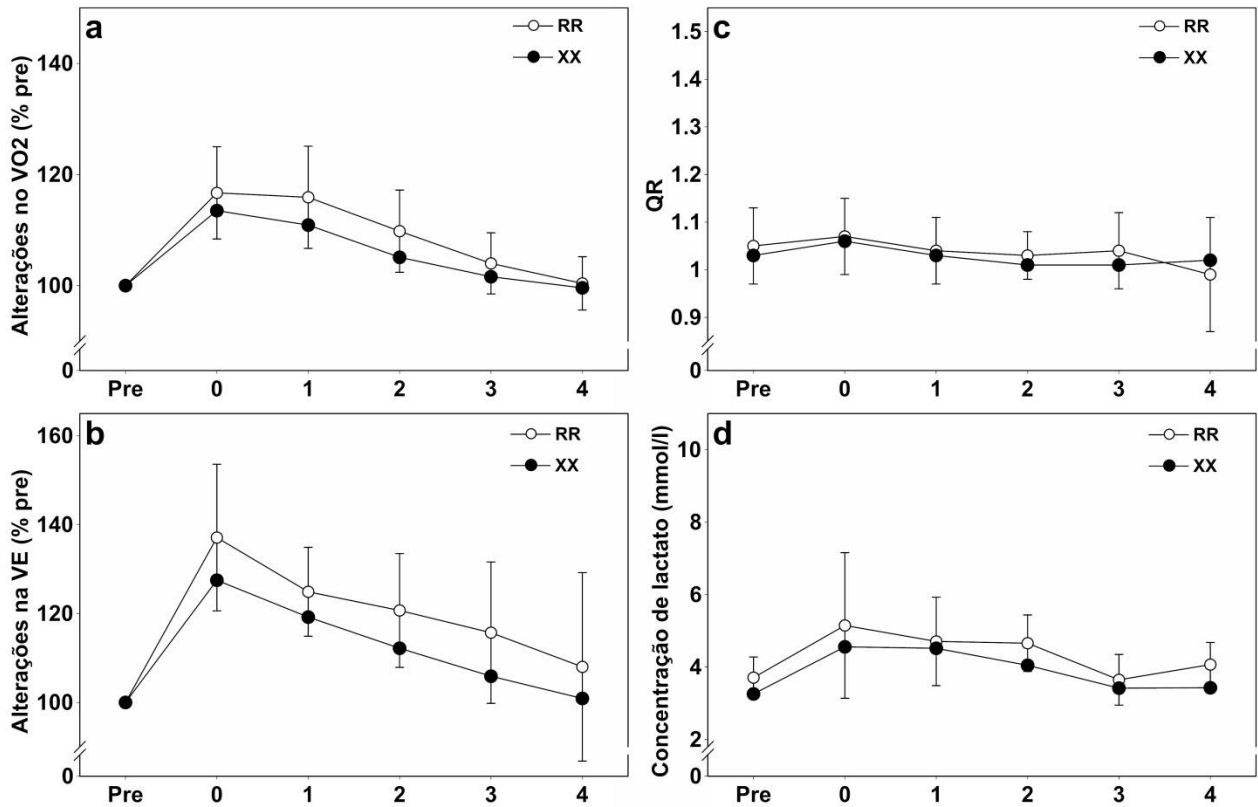
VO<sub>2</sub>: consumo de oxigênio; VE: ventilação; QR: coeficiente de trocas respiratórias; Lac: concentração sanguínea de lactato; PSE: percepção subjetiva de esforço; FP: frequência de passada; AP: amplitude de passada.

A Figura 19 apresenta as alterações nos valores de marcadores de dano muscular (amplitude de movimento, circunferência e CK) após a CrED em indivíduos dos dois polimorfismos do gene ACTN3 estudados. Efeitos significantes ( $p < 0,01$ ) do tempo (amplitude de movimento:  $F = 9,2$ ; circunferência da coxa:  $F = 6,8$ ; CK:  $F = 116$ ; percepção de dor:  $F = 63,4$ ) foram identificados para todos os marcadores de DM investigados. Entretanto, não foram identificados efeitos significantes de polimorfismos ou interação polimorfismos *vs* tempo para nenhuma dessas variáveis, com exceção da atividade sérica de CK, que apresentou efeito significativo de polimorfismo ( $p < 0,05$ ;  $F = 4,5$ ).

Também foram identificados efeitos significantes ( $p < 0,01$ ) do tempo para variáveis de torque (PTI:  $F = 30,7$ ; TDT:  $F = 7,1$ ), e altura de saltos (salto com contra movimento:  $F = 17,8$ ; *squat jump*:  $F = 16,3$ ). Não foram identificados efeitos dos polimorfismos nem de interação entre polimorfismos e tempo para essas variáveis, com exceção do PTI, que apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do grupo ( $F = 6,4$ ). Mudanças ao longo do tempo nas variáveis de torque e

força medida por meio de saltos seguem representadas graficamente nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

**Figura 17.** Alterações em variáveis metabólicas de economia de corrida ao longo do tempo (dias) entre os polimorfismos do gene ACTN3 induzidas pela corrida em declive.



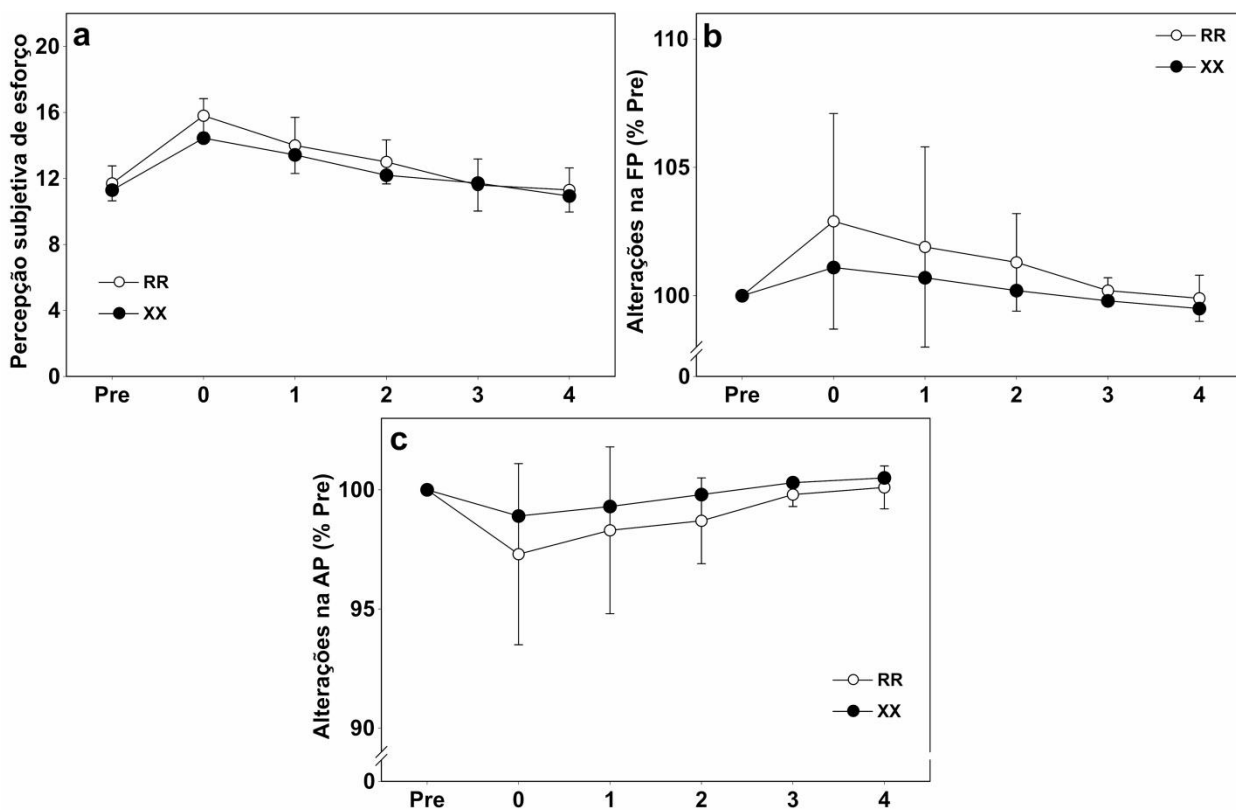
a) VO<sub>2</sub>: consumo de oxigênio; b) VE: ventilação; c) QR: coeficiente de trocas respiratórias; d) concentração de lactato sanguíneo.

**Tabela 7.** Valores (médias  $\pm$  DP) de marcadores de dano muscular obtidos antes da corrida em declive para os indivíduos com os diferentes polimorfismos do gene ACTN3.

	RR (n=10)	XX (n=10)
ADM (°)	135 $\pm$ 6	132 $\pm$ 7
CIR (cm)	56,4 $\pm$ 4,8	54,1 $\pm$ 3,5
CK (U.l <sup>-1</sup> )	112 $\pm$ 54	109 $\pm$ 28

ADM: amplitude de movimento do joelho; CIR: circunferência da porção medial da coxa; CK: atividade sérica da enzima creatina quinase.

**Figura 18.** Alterações em variáveis perceptuais e biomecânicas de economia de corrida entre os polimorfismos do gene ACTN3 ao longo do tempo (dias) induzidas pela corrida em declive.



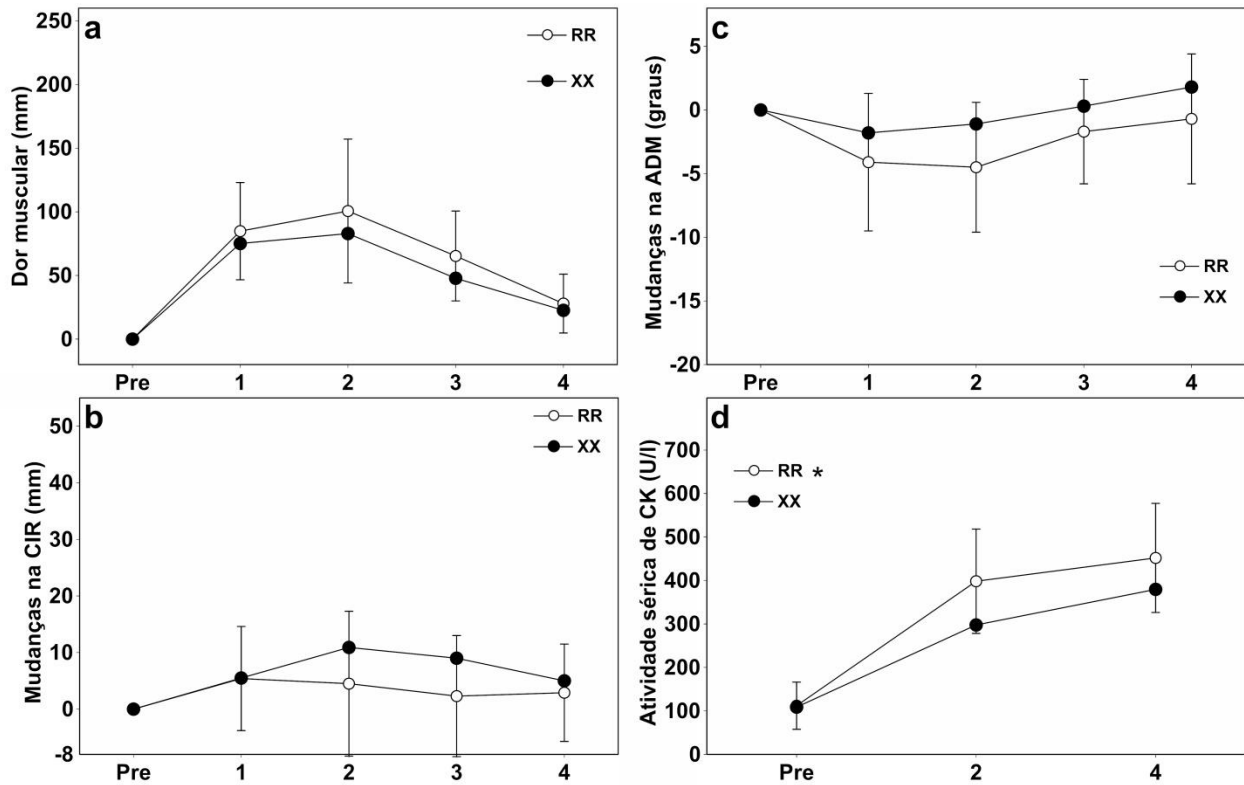
a) percepção subjetiva de esforço; b) FP: frequência de passos; c) AP: amplitude de passada

**Tabela 8.** Valores (médias  $\pm$  DP) de variáveis relacionadas ao torque obtidos antes da corrida em declive para os indivíduos com os diferentes polimorfismos do gene ACTN3.

	RR (n=10)	XX (n=10)
PTI (Nm)	283 $\pm$ 29	304 $\pm$ 38
TDT (Nm.s <sup>-1</sup> )	772 $\pm$ 307	826 $\pm$ 214

PTI: pico de torque isométrico; TDT: taxa de desenvolvimento de torque.

**Figura 19.** Alterações em marcadores de dano muscular ao longo do tempo (dias) e entre os polimorfismos do gene ACTN3 induzidas pela corrida em declive.



a) dor muscular; b) CIR: circunferência da porção medial da coxa; c) ADM: amplitude de movimento do joelho; d) Atividade sérica da enzima creatina quinase. \*Efeito significante de polimorfismos.

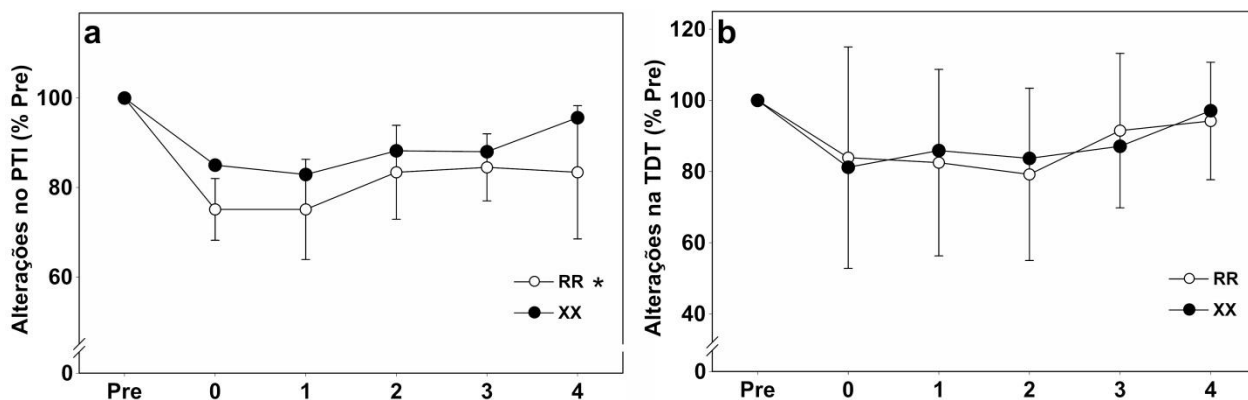
**Tabela 9.** Valores (medias  $\pm$  DP) de variáveis obtidas a partir de saltos com contra movimento e *squat jumps* antes da corrida em declive para os indivíduos com os diferentes polimorfismos do gene ACTN3.

	RR (n=9)	XX (n=9)
$F_r$ SCM (N)	1896 $\pm$ 224	1706 $\pm$ 116
AS SCM (cm)	33 $\pm$ 4	33 $\pm$ 4
$F_r$ SJ (N)	1777 $\pm$ 247	1558 $\pm$ 193
AS SJ (cm)	30 $\pm$ 3	31 $\pm$ 4

$F_r$  SCM: força máxima de reação do solo durante salto com contra movimento; AS SCM: altura de salto com contra movimento;  $F_r$  SJ: força máxima de reação do solo durante *squat jump*; AS SJ: altura de *squat jump*.

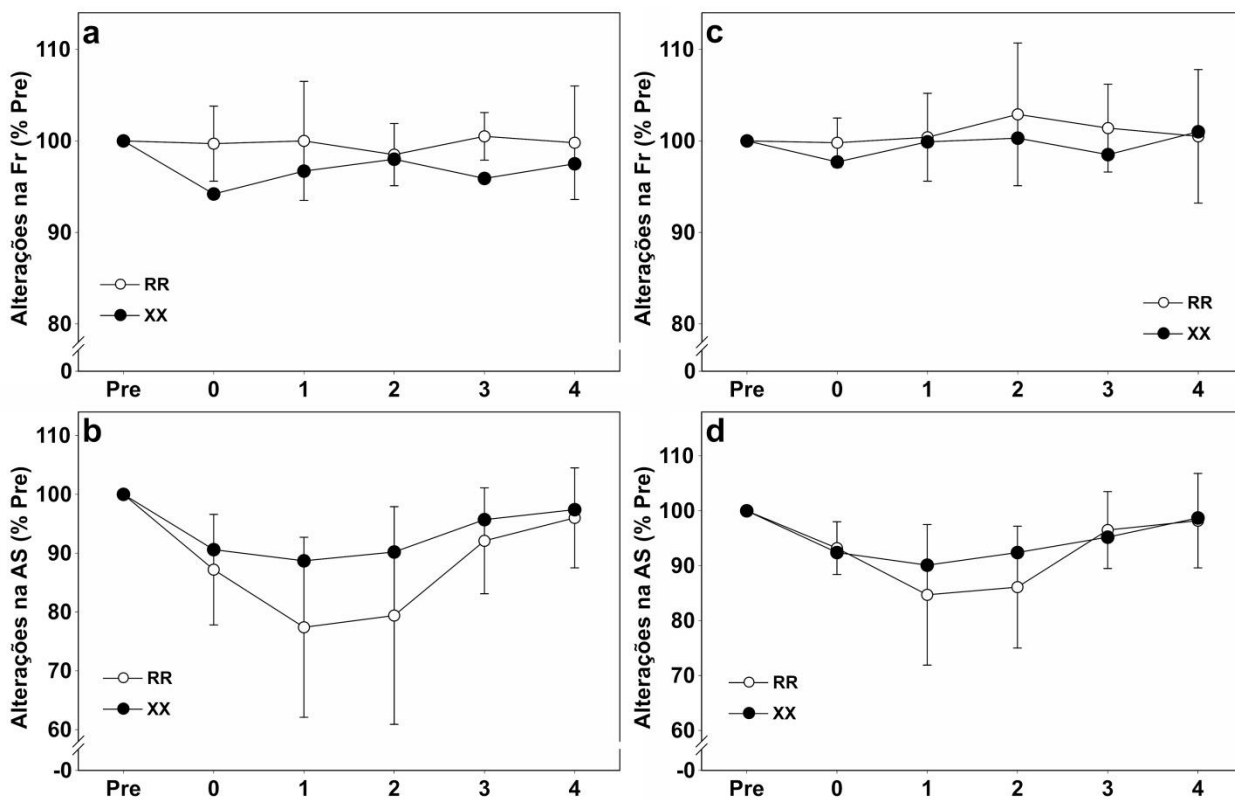


**Figura 20.** Alterações no pico de torque isométrico (a) e taxa de desenvolvimento de torque (b) ao longo do tempo (dias) e entre os polimorfismos do gene ACTN3 induzidas pela corrida em declive.



\*Efeito significante de polimorfismos.

**Figura 21.** Valores de força máxima de reação do solo e altura de salto durante saltos com contra movimento (a, b) e *squat jumps* (c, d) ao longo do tempo (dias) e entre os polimorfismos do gene ACTN3 induzidas pela corrida em declive.



## 9 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar a relação existente entre a produção de força muscular e a EC utilizando o modelo de dano muscular induzido pela CrED. Para tanto, foram utilizadas estratégias de atenuação do DM que atuam sobre diferentes sintomas do mesmo, de forma a manipular a magnitude deste e, potencialmente, a sua influência na EC. Além disso, a produção de força muscular foi medida de maneiras diferentes no presente estudo, englobando tanto medidas inespecíficas à atividade de corrida (contrações isométricas máximas com cadeia cinética aberta) quanto específicas (produção de força e altura de saltos que utilizam, ou não, o ciclo alongamento-encurtamento). Para fins didáticos, os efeitos dos tratamentos utilizados no presente estudos serão discutidos de acordo com as variáveis medidas (EC, dano muscular e força muscular) e, posteriormente, sob uma perspectiva integrada, considerando essas variáveis em conjunto.

### 9.1 Economia de corrida

Foi identificado efeito significativo do tempo para todas as variáveis de EC coletadas, demonstrando que o presente estudo corrobora com a literatura no que diz respeito ao comprometimento da EC induzido pela CrED (ASSUMPÇÃO et al., 2013). Não foi identificado, entretanto, efeito significativo entre os grupos para nenhuma das variáveis de EC. Isso pode ter ocorrido devido às alterações na EC serem de magnitude reduzida, sendo que a presença de dois grupos controle (CON e PLA) pode ter atenuado este efeito. Entretanto, foi identificada interação significativa entre grupo e tempo para o consumo de oxigênio, ventilação, concentração sanguínea de lactato e percepção subjetiva de esforço (Figuras 12 e 13).

Os grupos CON e ISO apresentaram cinéticas de alterações no consumo de oxigênio similares às reportadas na literatura, após a CrED (CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2009). Dessa forma, parece que execução de CIM previamente à CrED não parece conferir um efeito protetor contra o comprometimento da EC. As demais variáveis parecem corroborar com essa afirmação, também. É importante levar em consideração que a proteção contra o dano muscular conferida pelo pré-condicionamento com contrações isométricas máximas (CIM) parece estar relacionada a mecanismos fisiológicos específicos como o fortalecimento da matriz extracelular dos miócitos e,

em menor escala, a atenuação da resposta inflamatória ao estresse induzido pelo exercício excêntrico (LIMA & DENADAI, 2015; HYDAHL et al., 2017). Ademais é prudente observar que o presente estudo é o primeiro a investigar o uso de CIM como estratégia de proteção contra o dano muscular induzido por CrED, uma vez que o corpo de literatura a respeito desse tipo de intervenção foi construído utilizando contrações excêntricas intensas ou máximas como forma de indução do dano muscular (LIMA & DENADAI, 2015). Pouco se sabe, porém, sobre os mecanismos exatos por trás da indução do dano muscular a partir de CrED e especula-se que esse seja induzido majoritariamente por um estado de estresse oxidativo associado ao estresse mecânico resultante da realização de um número considerável de contrações excêntricas submáximas (VERNILLO et al., 2017).

O grupo PLA apresentou recuperação mais acelerada da EC em relação ao grupo CON, o que sugere que o consumo de carboidratos pode influenciar na recuperação da EC após o DM. De fato há evidências de que o consumo de carboidratos interfere na recuperação após o dano muscular, provavelmente por atenuar a liberação da interleucina-6 (uma importante citocina pró-inflamatória), como demonstrado por Keller et al. (2003). Além de um possível papel do consumo de carboidratos na recuperação do DM, a manifestação do efeito placebo não pode ser ignorada.

O tratamento que surtiu efeito mais pronunciado na proteção contra o comprometimento da EC após a CrED foi o consumo do suplemento antioxidante. Ambos os grupos que consumiram este suplemento (SUP e COMB) apresentaram recuperação mais rápida nas variáveis de EC quando comparados aos grupos que não o consumiram. Não houve, entretanto, efeito protetor adicional conferido pela realização de CIM por parte do grupo COMB. Os dados obtidos a partir dos grupos SUP e COMB sugerem, na verdade, que o consumo de um suplemento rico em compostos fenólicos e de forte potencial antioxidante produz um efeito protetor similar ao do consumo de concentrados de cereja abundantemente estudados (LIMA et al., 2015). De fato, levando em consideração o consumo de oxigênio, pode-se considerar que essa estratégia anula os efeitos do DM na EC, uma vez que o único ponto temporal significativamente diferente dos valores basais dessa variável nos dois grupos que consumiram o suplemento é imediatamente após a CrED. Levando isso em consideração, pode-se atribuir esse comprometimento da EC à fadiga resultante de uma atividade aeróbia, e não ao DM.

Um dos mecanismos propostos na literatura, que explicam a atenuação e/ou aceleração da recuperação do DM conferida pelo consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos, é o potencial antioxidante conferido por esses compostos (KUEHL, 2012; BELL et al., 2014; LIMA et al., 2015). Há relatos detalhados que demonstram que o consumo de suco de cerejas amarelas (*Prunus Cerasus L.*) leva a reduções no status oxidativo total, proteína C-reativa e outras espécies reativas de oxigênio (KELLEY et al., 2006; HOWATSON et al., 2010; BOWTELL et al., 2011). Esse efeito ocorre devido à ação das antocianinas e outros compostos fenólicos, que sequestram os radicais livres secretados por linfócitos e produzidos durante o exercício aeróbio nas mitocôndrias, na cadeia transportadora de elétrons (MASTALOUDIS et al., 2004). Já foi demonstrado, também, um efeito anti-inflamatório conferido pelas antocianinas presentes em frutos de cor escura, com diminuição significativa de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa (HOWATSON et al., 2010; BELL et al., 2015). Embora não tenham sido coletados marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no presente estudo, consideramos que o corpo de conhecimento existente acerca da relação existente entre o consumo de alimentos ricos em antocianinas (e outros compostos fenólicos) com a alta concentração desses fitoquímicos no suco utilizado (maior, inclusive, do que aquelas reportadas nos estudos que demonstraram esses efeitos) pode corroborar com os dados encontrados. Além da alta concentração de antocianinas no suco utilizado no presente estudo, também pode ser identificado, em exames laboratoriais, um efeito antioxidante significativo e, inclusive, maior do que o reportado nos sucos de cereja utilizados nos estudos que apresentaram atenuações nos principais marcadores pró-inflamatórios e de estresse oxidativo (HOWATSON et al., 2010; BOWTELL et al., 2011; BELL et al., 2015).

Estudos anteriores demonstraram que o consumo de alimentos ricos em antocianinas atenuou e/ou acelerou a recuperação do DM medido por variáveis como força, dor muscular e extravasamento de algumas proteínas intracelulares para a circulação (LIMA et al., 2015). Não há, entretanto, estudos de nosso conhecimento que investigaram o efeito dessa estratégia nutricional em alterações na EC, relacionadas ao DM. No presente estudo, além de confirmar o efeito protetor desse tipo de estratégia contra o DM (discutido mais adiante), foi identificada, também, proteção contra as alterações na EC. Por ser estritamente ligado ao metabolismo, resposta inflamatória e ação antioxidante, esse tipo de tratamento não foi efetivo no comprometimento da EC imediatamente após a CrED, uma vez que essas parecem ser causadas

pelo estresse mecânico agudo induzido pelas diversas contrações excêntricas realizadas durante a corrida e, também, pela depleção de parte considerável dos substratos energéticos e fadiga central (ESTON et al., 1995; ENOKA, 1996).

Em estudo recente ainda não publicado (LIMA et al., em submissão), demonstramos não haver correlação significativa entre a diminuição da capacidade de produção de força e alterações no consumo de oxigênio após CrED. Também não foram identificadas correlações entre o aumento do consumo de oxigênio e outros marcadores de DM. A partir desses dados, e de outros estudos que demonstraram que o dano muscular leva a um aumento na taxa metabólica basal (JAMURTAS et al., 2004; BURT et al., 2014), podemos especular que a ação antioxidante do suco utilizado no presente estudo pode ter atenuado a resposta inflamatória, inibindo, também a síntese proteica a qual se atribui cerca de 20% do aumento da taxa metabólica basal após o dano muscular. Dessa forma, é possível especular que a ação do suco antioxidante no consumo de oxigênio identificada no presente estudo pode estar relacionada não apenas à atenuação da perda de força, mas também à atenuação do aumento de fatores metabólicos que podem vir a influenciar a EC após a CrED.

As variáveis cinemáticas de corrida apresentaram efeito significativo do tempo, mas não apresentaram interação grupo *vs* tempo significativo nem efeito significativo de grupo, o que demonstra que nenhum dos tratamentos parece atenuar as alterações nessas variáveis induzidas pela CrED.

## **9.2 Dano muscular**

Efeitos significantes do tempo foram identificados em todos os marcadores de DM coletados, corroborando com o que vem sendo demonstrado na literatura que investiga os efeitos de corridas em declive sobre o sistema neuromuscular (CHEN et al., 2009; ASSUMPÇÃO et al., 2013). Foram identificadas, também, significâncias nas interações grupo *vs* tempo e no efeito do grupo para a circunferência da coxa e percepção subjetiva de dor. As únicas diferenças significantes identificadas na circunferência da coxa após análise par a par foram entre os grupos PLA e SUP, medidas 72 e 96 horas após a CrED. Essas diferenças, entretanto, parecem ter atingido significância devido à notável heterogeneidade entre grupos para essa variável. Embora outros autores utilizem essa variável com frequência sem identificar tamanha heterogeneidade

(NOSAKA et al., 2007; CHEN et al., 2011a; CHEN et al., 2012a) acreditamos que a inclusão dos voluntários baseada no nível de atividade física pode ter permitido uma variação considerável no que diz respeito à circunferência da coxa. Dessa forma, aumentos relativamente pequenos dessa variável no grupo PLA, acompanhados por aumentos ainda menores no grupo SUP, apontaram para uma diferença que parece não ter significado relevante para o contexto do estudo. Pode-se também discutir a reprodutibilidade desse tipo de medida.

No que diz respeito à percepção subjetiva de dor, o consumo do suplemento antioxidante parece ter exercido um papel de aceleração da recuperação dessa variável, evidenciada pelo retorno ao nível basal dessa variável no grupo SUP, em contraste com os grupos CON, PLA e, surpreendentemente, COMB. A realização de CIM dois dias antes da CrED conferiu, também, um efeito de aceleração da recuperação da dor muscular, de maneira similar ao que vem sendo demonstrado na literatura (LIMA & DENADAI, 2015). Também foi demonstrada uma atenuação dos valores dessa variável nos dois grupos que ingeriram o suplemento (SUP e COMB) dois dias após a CrED em relação aos grupos CON e PLA. Essa diferença de magnitude se manteve significativa para ambos os grupos que consumiram o suplemento e o grupo PLA três dias após a CrED. A realização de CIM dois dias antes da CrED conferiu, também, a diminuição da magnitude da dor muscular 4 dias após a CrED, em comparação com o grupo PLA.

Os efeitos analgésico e de aceleração da recuperação da dor encontrado no presente corroboram com estudos que investigaram os efeitos do consumo de sucos de cereja e outros alimentos ricos em compostos fenólicos na resposta ao DM induzido por diversos tipos de exercício (CONNOLLY et al., 2006; HOWATSON et al., 2010; BELL et al., 2014; LIMA et al., 2015). Os mecanismos que justificam esse efeito são os mesmos discutidos acima, em relação à EC (i.e., atenuação da resposta inflamatória que promove um quadro de hiperalgesia). A aceleração da recuperação da dor muscular identificada no grupo ISO já foi demonstrada em modelos anteriores (CHEN et al., 2012a; CHEN et al., 2012b) e pode estar relacionada a mecanismos de caráter mecânico - como o fortalecimento da matriz extracelular e aumento da complacência do tendão induzidos pelas CIM (KAY & BLAZEVIK, 2009; MACKEY et al., 2011) -, como, também, mecanismos fisiológicos - como a ativação de proteínas de choque térmico e uma atenuação da resposta inflamatória, também reportados após a realização de CIM (McARDLE et al., 2001; PIZZA et al., 2001). A ausência de efeito protetor significativo na PSD para o grupo COMB é intrigante, uma vez que este grupo realizou, simultaneamente, dois

tratamentos que se mostraram eficientes na atenuação e/ou aceleração da recuperação desse marcador de DM.

A atividade sérica de CK apresentou aumento significativo dois dias após a CrED e pico 4 dias após a mesma para todos os grupos. Dois dias após a CrED, foi identificada diferença significativa entre a atividade sérica de CK dos grupos CON e ISO, que se manteve quatro dias após a CrED. Neste momento também foi identificada atividade sérica de CK significativamente mais elevada para o grupo CON quando comparado com os grupos SUP e COMB. Os dados obtidos sugerem que o pré-condicionamento com CIM levou a uma atenuação do extravasamento de CK para a circulação em todos os momentos investigados no presente estudo, o que corrobora com estudos que apontam o fortalecimento da matriz extracelular dos miócitos como um dos principais mecanismos de proteção após pré-condicionamento com CIM (HYDAHL et al., 2017). O consumo do suco rico em antocianinas (e outros compostos fenólicos) também resultou em atenuação da atividade sérica de CK no presente estudo. Essa atenuação pode ter sido resultado de uma ação anti-inflamatória e antioxidante do suco, diminuindo a degradação da membrana celular de miócitos saudáveis nos dias subsequentes à CrED e, portanto, o extravasamento de CK para a circulação.

### **9.3 Força muscular**

Um achado notável do presente estudo foi a aceleração da recuperação do torque quando da realização de CIM dois dias antes da CrED. A maior parte dos estudos que demonstraram um efeito protetor induzido por CIM foram realizados com os flexores do cotovelo de voluntários não treinados (CHEN et al., 2012a; CHEN et al., 2012b; CHEN et al., 2013). O único estudo de nosso conhecimento que investigou a eficácia dessa estratégia de proteção contra o dano muscular nos extensores do joelho, utilizou um protocolo de CIM de alto volume que levou a alterações em marcadores de dano muscular. Sabe-se que há diferenças significativas entre a susceptibilidade ao DM entre os músculos de membros superiores e inferiores, devido ao elevado grau de proteção conferido aos segundos por atividades de vida diária (CHEN et al., 2011a). Também foi demonstrado que a magnitude do efeito protetor contra o DM induzido por sessões repetidas de exercícios excêntricos máximos difere entre esses grupos musculares (LIMA &

DENADAI, 2011). Considerando esses fatores, é interessante notar que uma estratégia de baixa intensidade e complexidade possa levar à proteção contra a diminuição do torque induzida por uma atividade tão estressante quanto a CrED, durante a qual são realizadas mais de mil contrações excêntricas submáximas.

Embora não tenha sido identificada diferença entre a magnitude dos valores de torque do grupo ISO em relação ao grupo CON em nenhum dos momentos investigados, a aceleração da recuperação dessa variável pode ser considerada como um efeito benéfico conferido pelas CIM. Esse efeito parece não ser associado com as alterações na EC, entretanto, uma vez que esta não apresentou diferenças temporais nem de magnitude entre os grupos ISO e CON.

Embora não tenha atenuado a magnitude do comprometimento do pico de torque isométrico imediatamente ou um dia após a CrED, o consumo do suco antioxidante utilizado no presente estudo levou a uma aceleração na cinética de recuperação dessa variável. O pico de torque isocinéticos dos grupos SUP e COMB retornou aos níveis basais dois dias após a CrED, sendo que os grupos CON e PLA sequer apresentaram recuperação completa dessa variável ao longo do período investigado. Os mecanismos que justificam tal aceleração na cinética de recuperação são os mesmos que foram discutidos no tópico sobre a EC (i.e., ação anti-inflamatória e antioxidante das antocianinas e outros compostos fenólicos que atenuariam o dano secundário, de caráter inflamatório). A aceleração da recuperação do pico de torque isométrico no presente estudo corrobora com outros estudos que investigaram os efeitos do consumo de sucos de cereja como estratégia de recuperação do dano muscular induzido por corridas de longa distância (HOWATSON et al., 2010) ou exercícios resistidos (BOWTELL et al., 2011). Entretanto, em alguns desses estudos também foi identificado um efeito significativo de grupos, apontando para, além de uma cinética acelerada de recuperação, menores magnitudes de perda de força quando essa estratégia de recuperação foi utilizada.

A taxa de desenvolvimento de torque (TDT), embora significativamente afetada pela CrED, não apresentou efeito significativo de grupo ou de interação grupo *vs* tempo, o que nos leva a concluir que os tratamentos adotados no presente estudo não exercem influência direta sobre a produção de força rápida ou explosiva.



Uma das hipóteses a serem testadas no presente estudo é que a força, quando medida em cadeia cinética fechada, pode apresentar uma recuperação similar à da EC. Para tanto, foram medidas a força máxima de reação do solo e a altura de dois diferentes tipos de salto: salto com contra movimento e *squat jump*. A razão da adoção de dois tipos de saltos é a utilização, ou não, do ciclo alongamento-encurtamento durante esses. Nenhum dos tratamentos investigados no presente estudo exerceu influência significativa na recuperação de nenhuma das variáveis medidas a partir de saltos com e sem contra movimento. Foi identificado efeito significativo do tempo para a força máxima de reação do solo durante os dois tipos de salto. Porém, o único momento em que essa variável foi comprometida (em ambos os saltos) foi imediatamente após a CrED. A recuperação completa da força máxima de reação do solo um dia após a CrED sugere que essa variável não foi influenciada pelo dano muscular, mas possivelmente pela fadiga induzida pelo protocolo de exercício. A altura de salto, porém, apresentou diminuição significativa até três dias após a CrED para ambos os tipos de salto. A redução na altura de salto (independente do tipo de salto estudado) e a preservação da força máxima de reação do solo nos dias subsequentes à CrED sugere que o estresse induzido por esta acomete principalmente a capacidade de produção de força rápida, mas não máxima, quando medida em cadeia cinética fechada.

Uma limitação que pode ser apontada na comparação das diferentes manifestações da força muscular com a EC está relacionada ao tipo de avaliação da força em cadeia cinética fechada. Embora tenham sido coletados e analisados dados de manifestações da força similares às utilizadas durante a corrida (concêntrica e dinâmica), poderiam ter sido medidas, também, variáveis relacionadas à força máxima isométrica em cadeia cinética fechada. A forma de avaliação desse tipo de força priorizou medidas relacionadas à potência muscular e não à força máxima (como é o pico de torque isométrico, para a força de cadeia cinética aberta).

#### **9.4 Polimorfismo do gene ACTN3**

Para a investigação dos efeitos do polimorfismo do gene ACTN3 nas alterações na EC e em marcadores de DM após a CrED, participantes que não realizaram nenhuma estratégia de pré-condicionamento e/ou recuperação foram genotipados e separados em dois grupos de acordo com os seus polimorfismos (XX e RR). Foram identificados efeitos significantes do tempo para todos

os marcadores de EC, com exceção do QR, após a CrED, corroborando com estudos prévios (BRAUN & DUTTO, 2003; CHEN et al., 2007). Entretanto, não foi identificado efeito significativo dos polimorfismos nem de interação polimorfismo *vs* tempo para nenhuma das variáveis de EC coletadas no presente estudo. A não existência desses efeitos indica que, aparentemente, embora pareça influenciar a EC medida em níveis basais (PASQUA et al., 2015), o polimorfismo do gene ACTN3 parece não ser um fator determinante na susceptibilidade de alterações nessa frente ao estresse induzido pela CrED.

Levando em consideração os marcadores de DM coletados no presente estudo, também foram identificados efeitos significantes do tempo para todos sem, entretanto, efeitos significantes de interação polimorfismo *vs* tempo. Foi identificado efeito significativo do polimorfismo para a CK, apontando para valores mais elevados de atividade sérica de CK para o grupo RR após a CrED. Esse achado é conflitante com os de Pimenta et al. (2011), que identificou resposta mais expressiva desse marcador em indivíduos XX. Entretanto, o presente estudo corrobora com o de Venckunas et al. (2012). No que diz respeito aos demais marcadores de DM, os dados obtidos são conflitantes com o que tem sido demonstrado por outros autores (CLARKSON et al., 2005; VINCENT et al., 2010; PIMENTA et al., 2011; SETO et al., 2011), que identificaram diferenças na magnitude do DM muscular sofrido por indivíduos dos diferentes polimorfismos do gene ACTN3. Vincent et al. (2010), por exemplo, demonstraram alterações mais pronunciadas na dor muscular em indivíduos XX. É possível especular, a partir dos dados apresentados na figura 19, que a magnitude das alterações em marcadores de DM entre os indivíduos com os dois diferentes polimorfismos investigados parece ser diferente. Em especial, o grupo RR parece apresentar aumentos maiores na percepção subjetiva de dor, o que confirmaria a nossa hipótese que indivíduos R577X se valeriam de um ECR fenotípico conferido por exposição sucessiva ao DM durante atividades de vida diária (CHEN et al., 2011a; LIMA & DENADAI, 2011) e, portanto, sofreriam menores magnitudes desse após a CrED. Entretanto, tais especulações não foram confirmadas estatisticamente a partir da amostra atual.

Ambas as variáveis de torque muscular coletadas no presente estudo apresentaram efeito significativo do tempo após a CrED. Entretanto, o pico de torque isométrico apresentou, também, efeito significativo do polimorfismo, indicando que o grupo RR apresentou maiores alterações na sua capacidade de produção de força isométrica em relação ao grupo XX. Não foi identificado

efeito significativo de interação polimorfismo *vs* tempo para nenhuma das variáveis acima citadas. Foram identificados, também, efeitos significantes do tempo para a altura de SCM e SJ.

A menor magnitude de alteração na força isométrica para o grupo XX confirma a hipótese de que a musculatura dos participantes desse polimorfismo apresenta menor susceptibilidade ao DM e corrobora com os achados de Venckunas et al. (2012). Esse raciocínio é corroborado pelo efeito significativo de polimorfismo identificado para a atividade sérica de CK, demonstrando incrementos maiores para o grupo RR. Pode-se especular que um eventual ECR fenotípico do qual indivíduos XX podem vir a se beneficiar (VENCKUNAS et al., 2012) tenha atenuado a diminuição da capacidade de produção de força a partir dos mecanismos adaptativos propostos por Hydahl et al (2017). Em especial, no que diz respeito à manifestação da força isométrica máxima, o fortalecimento dos retículos sarcoplasmáticos de indivíduos XX (conferido pelo ECR), pode ter sido responsável pela manutenção da homeostase do cálcio no miócito, levando a menores comprometimentos do acoplamento excitação-contração após a CrED. As alterações na atividade sérica de CK para ambos os polimorfismos sugerem ter havido pouco dano tecidual induzido pela CrED, portanto a hipótese da proteção do retículo sarcoplasmático se sustenta no presente estudo, uma vez que, aparentemente, não houve dano extensivo às proteínas contráteis.

Outro possível fator associado ao polimorfismo do gene ACTN3 que pode ter influenciado a susceptibilidade ao DM (evidenciada por diferentes magnitudes de alteração do PTI e da atividade sérica de CK) dos participantes do presente estudo é a complacência muscular. Kikuchi et al. (2017) demonstraram, em um estudo transversal com um número amostral considerável ( $n = 2033$ ) que indivíduos RR têm os músculos flexores do joelho e extensores do quadril menos complacentes do que indivíduos portadores do alelo nonsense (X), a partir do teste de *sit and reach*. A menor complacência observada em músculos da cadeia posterior em indivíduos RR por Kikuchi et al. (2017) pode ser justificada pelo aumento do módulo de elasticidade de Young (um parâmetro mecânico que quantifica a rigidez de um material sólido) das fibras musculares desses indivíduos. Há evidências, obtidas a partir de estudos *in vitro*, de que um aumento do módulo de elasticidade de Young está associado ao maior conteúdo da proteína estrutural titina (TOURSEL et al., 2002), que é um dos componentes que contribuem com a rigidez passiva do músculo esquelético (TSKHOVREBOVA & TRINICK, 2010). Sabe-se, também, que variações nas isoformas de titina são determinantes da rigidez passiva dos

sarcômeros, especialmente em fibras do tipo II (PRADO et al., 2005), sendo que indivíduos RR possuem maior distribuição desse tipo de fibras (SETO et al., 2013). Entretanto, Kim et al. (2014) demonstraram que, dentre dançarinas experientes de ballet, aquelas que sintetizavam a proteína  $\alpha$ -actinina-3 (genótipo RX + RR) apresentaram melhor desempenho no teste de *sit and reach*. Os dados de Kim et al. (2014) devem ser interpretados com cautela, uma vez que a população investigada realiza extensivas rotinas de treinamento de flexibilidade, o que pode mascarar possíveis influências do polimorfismo do gene ACTN3 na mesma. Porém, ainda não há estudos de nosso conhecimento que tenham investigado os efeitos do polimorfismo do gene ACTN3 na responsividade ao treinamento de flexibilidade.

Há, entretanto, evidências que demonstram que músculos mais complacentes sofrem menores magnitudes de DM (CHEN et al., 2011b; CHEN et al., 2015; HICKS et al., 2016). Hicks et al. (2016) demonstraram que mulheres são menos suscetíveis ao DM provavelmente devido à maior complacência dos grupos musculares danificados. Em um estudo clínico randomizado de característica longitudinal, CHEN et al. (2011b) corroboraram com essa hipótese, demonstrando que o treinamento de flexibilidade levou à diminuição da susceptibilidade ao DM. Portanto, sabendo que o polimorfismo R577X do gene ACTN3 confere maior complacência ao tecido muscular (KIKUCHI et al., 2017) e que músculos complacentes tendem a sofrer menores magnitudes de DM após exercícios excêntricos (HICKS et al., 2016; CHEN et al., 2011b), é razoável considerar que esse possa ser um dos principais mecanismos por trás do efeito significativo do polimorfismo no PTI identificado no presente estudo.

Diferenças na manifestação do DM após atividades similares à CrED em portadores dos diferentes polimorfismos do gene ACTN3 já foram investigadas previamente (BELLI et al., 2017; DEL COSO et al., 2016a; DEL COSO et al., 2017b). Entretanto, esses estudos apresentaram, por motivos particulares a cada um, limitações no que diz respeito aos momentos de coleta dos marcadores de DM. O presente estudo é o primeiro, de nosso conhecimento, a investigar a influência dos polimorfismos genéticos do gene ACTN3 na resposta de marcadores de DM a um evento de endurance conhecidamente danificador (BRAUN & DUTTO, 2003; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2009) a médio prazo (i.e., 4 dias). É importante ressaltar que o DM não é a única variável que pode influenciar a capacidade de produção de força após eventos

danificadores. Além disso, este é o primeiro estudo a investigar a influência desses polimorfismos na resposta da EC ao exercício excêntrico de longa duração e baixa intensidade.

### **9.5 Economia de corrida vs força muscular**

O objetivo principal do presente estudo foi investigar a relação entre a força muscular e a EC. Diversos estudos demonstraram que o dano muscular (principalmente aquele induzido por corrida em declive ou corrida de longa distância) leva a uma diminuição da economia de corrida (BRAUN & DUTTO, 2003; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2009). Alguns desses estudos sugerem que essa perda de eficiência é uma consequência da diminuição da capacidade de produção de força máxima pela musculatura dos membros inferiores, um dos principais marcadores de dano muscular. Há, também, autores que sugerem que alterações cinemáticas durante a corrida induzidas pelo dano muscular, como aumento da frequência de passada e prolongamento do tempo em contato com o solo, levam a um aumento do gasto energético durante a corrida (BRAUN & DUTTO, 2003).

Corroborando com a noção que a força muscular está relacionada à EC, estudos demonstraram que o treinamento de força máxima ou explosiva leva a uma melhora considerável na EC (STOREN et al., 2008; ALBRACHT & ARAMPATZIS, 2013). De fato, em uma metanálise recente, demonstramos que esses tipos de treinamento levam a adaptações neuromusculares que influenciam o desempenho aeróbio medido por meio da EC (DENADAI et al., 2017). Algumas dessas adaptações, como aumento da capacidade de produção de força (máxima e/ou rápida) e são o oposto do que ocorre durante um quadro de dano muscular induzido pelo exercício (ALBRACHT & ARAMPATZIS, 2013).

No presente estudo, foram adotadas algumas estratégias de prevenção (pré-condicionamento isométrico) ou recuperação (consumo de suco rico em antocianinas e compostos fenólicos) do dano muscular induzido pelo exercício como forma de manipular alguns dos sintomas deste e investigar a influência dessas alterações nas mudanças na EC após CrED. Foram identificados efeitos diferentes na EC e em marcadores de dano muscular a partir dos diferentes tipos de tratamento. Pudemos identificar, no presente estudo, uma dissociação

temporal entre as recuperações da EC e da força muscular, como descrito por Assumpção et al. (2013). Essa dissociação se manteve mesmo quando alguns dos tratamentos adotados (grupos SUP e COMB) aceleraram a recuperação da EC (retorno do  $\text{VO}_2$  a níveis basais no dia seguinte à CrED), também acelerando a recuperação do pico de torque isométrico. Esses tratamentos, porém, não aceleraram a recuperação da força medida em cadeia cinética fechada no presente estudo. Isso poderia indicar que, ao contrário do que hipotetizamos, a força muscular medida em cadeia cinética aberta pode estar mais relacionada à EC do que aquela medida em cadeia cinética fechada. Entretanto, a dissociação temporal entre a recuperação da força muscular medida por contrações isométricas máximas em cadeia cinética aberta e a EC se manteve independente da estratégia de atenuação do dano muscular utilizada.

Dados ainda não publicados que foram obtidos a partir do presente estudo demonstraram a inexistência de correlações significantes entre mudanças no consumo de oxigênio e em diversos marcadores de dano muscular após CrED (LIMA et al., em submissão). Foram identificados incrementos significantes no consumo de oxigênio imediatamente após a CrED e nos dois dias subsequentes a ela, enquanto a capacidade de produção de força medida por contrações máximas em cadeia cinética aberta (medida pico de torque isométrico e taxa de desenvolvimento de torque) se manteve comprometida até três dias após a mesma. A altura de saltos com contra movimento e *squat* jumpos apresentou cinética de recuperação similar à da EC. Entretanto, também não foram encontradas correlações significantes entre as mudanças nesses marcadores de força muscular e a EC após a CrED.

Esses resultados indicam que a diminuição da força muscular pode, sim, colaborar com o aumento do custo energético durante a corrida, mas não ser o único, nem o principal, fator por trás desse fenômeno. Os dados de Hotta et al. (2016) corroboram com essa hipótese, demonstrando que o aumento da intensidade relativa do exercício contínuo submáximo após o dano muscular (justificado pela diminuição da força máxima e manutenção da carga submáxima) não justifica o aumento da percepção subjetiva de esforço e ventilação. Especulamos, então, que a mudança na carga interna (i.e., resposta fisiológica aumentada frente ao mesmo trabalho) possa ser resultado da conjunção de diversos fatores e sintomas de dano muscular.

A discussão a respeito da influência de fatores genéticos em sistemas biológicos em detrimento de fatores comportamentais e/ou relacionados ao fenótipo não é recente no meio

acadêmico. Entretanto, a investigação do papel desses fatores no desempenho esportivo e na resposta do organismo ao exercício ainda é incipiente. Os resultados obtidos acerca da influência dos polimorfismos R577X do gene ACTN3 em marcadores de DM e EC até o momento demonstram que os diferentes polimorfismos desse gene parecem não atuar nas respostas da EC ao estresse induzido pela CrED. Também não foi identificada influência desses polimorfismos na magnitude e cinética de alteração na dor muscular, circunferência da porção medial da coxa e amplitude de movimento do joelho. A força isométrica máxima e a atividade sérica de CK, entretanto, parecem sofrer menores alterações em indivíduos XX após CrED. Considerando o objetivo geral do presente estudo, pode-se afirmar que os resultados obtidos demonstraram uma dissociação entre a EC e a força muscular, uma vez que a resposta da primeira à CrED não foi influenciada pelos polimorfismos enquanto a da segunda foi.

Cabe ressaltar que o dano muscular, assim como a EC, é um fenômeno multifatorial em que diversas estruturas e sistemas são acometidos (HYDAHL et al., 2017) e que é pouco provável que apenas um deles (i.e., a força muscular) comprometa a EC. Um desses fatores pode ser um aumento no gasto energético tanto em repouso (taxa metabólica basal) quanto em exercício (consumo excessivo de oxigênio após o exercício), como discutido anteriormente. Jamurtas et al. (2004) e Burt et al. (2014) demonstraram que o dano muscular leva a um aumento prolongado da taxa metabólica basal, que dura, pelo menos, até dois dias após a sessão danificadora. Esse aumento da taxa metabólica basal pode ser justificado, em parte, pela resposta inflamatória (PAULSEN et al., 2012) e aumento da síntese proteica (KEEFE & WRIGHT, 2016). Não coincidentemente, as alterações na EC identificadas no grupo controle no presente estudo e em outros (ASSUMPCÃO et al., 2013; LIMA et al., no prelo) ocorrem até 48 horas após as sessões danificadoras. Acreditamos que este aumento no metabolismo basal, associado com a diminuição da capacidade de produção de força, aumento da frequência de passada, manifestação da dor muscular de início tardio e outros marcadores de dano muscular, pode levar à diminuição da EC.

## **9.6 Limitações**

Como qualquer outro estudo, o presente apresenta algumas limitações. Uma delas, no estudo sobre a influência do consumo de suco antioxidante nas alterações na EC e em marcadores

de DM, diz respeito ao efeito placebo. Não foram controlados, no presente estudo, possíveis vieses de confirmação durante os experimentos que envolvessem o consumo de diferentes compostos (i.e., suco antioxidante ou placebo). Portanto, acreditamos que o fato de não termos perguntado se os participantes acreditavam estar consumindo o placebo ou o suco antioxidante possa ter mascarado um possível viés de confirmação por parte daqueles que acreditavam consumir o suco antioxidante ou, possivelmente, um efeito nocebo nos participantes que acreditavam consumir o placebo. Além disso, o sabor dos diferentes produtos não era similar. Entretanto, foi feito um esforço para que não houvesse contaminação cruzada e os voluntários de um grupo não soubessem o sabor do produto consumido pelo outro. Ainda em relação ao estudo de suplementação, não foi realizado o acompanhamento nutricional dos voluntários. Isso pode ser considerado como uma limitação do presente estudo, uma vez que diferenças no consumo total de proteínas ou outros alimentos ricos em antocianinas podem ter influenciado as respostas ao DM. Uma limitação nos estudos que investigaram a influência do pré-condicionamento isométrico nas respostas de EC e DM após a CrED foi a utilização de uma amplitude articular em que os extensores do joelho não se encontravam particularmente alongados. Entretanto, essa limitação foi proposital frente à escolha de um exercício de cadeia cinética fechada e, portanto, ecológico à atividade de corrida.



## 10 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

1 – O consumo de um suco antioxidante é capaz de acelerar a recuperação da EC após o dano muscular induzido pela CrED, atenuando a dor muscular no ponto em que ela é mais crítica e antecipando, também a recuperação da força muscular medida em cadeia cinética aberta (pico de torque isométrico).

2 – A realização de CIM em cadeia cinética fechada dois dias antes de uma CrED leva à aceleração da recuperação do dano muscular (torque e dor muscular) e à atenuação da dor muscular, mas esse efeito protetor não se transfere para a EC.

3 – A associação das duas estratégias acima parece não render efeito protetor além daquele conferido pelo consumo do suco antioxidante, apenas.

4 – Os diferentes polimorfismos do alelo R577 do gene ACTN3 parecem exercer influência na alteração de alguns marcadores de DM; em especial a capacidade de produção de torque máximo e a atividade sérica de CK. Entretanto, essa influência parece não se transferir para as alterações na EC medida por diferentes variáveis metabólicas, biomecânicas e perceptuais.

5 – Baseado em análises qualitativas das cinéticas de recuperação da força muscular, torque e EC (consumo de oxigênio), parece haver uma relação entre a força muscular e a EC. Entretanto, aparentemente, há outros fatores que também são alterados pelo DM e influenciam a EC.

## REFERÊNCIAS

- AAGAARD, P. et al. Increased rate of force development and neural drive of human skeletal muscle following resistance training. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 93, n. 4, p. 1381-1326, 2002.
- ALBRACHT, K.; ARAMPATZIS, A. Exercise-induced changes in triceps surae tendon stiffness and muscle strength affect running economy in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 113, n. 6, p. 1605-15, 2013.
- AMORIM, C. E. et al. Differing evolutionary histories of the ACTN3\*R577X polymorphism among the major human geographic groups. *PLoS One*, San Francisco, v. 10, n. 2, 2015.
- ARAMPATZIS, A. et al. Influence of the muscle-tendon unit's mechanical and morphological properties on running economy. *J. Exp. Biol.*, London, v. 209, n. Pt 17, p. 3345-57, 2006.
- ARAMPATZIS, A. et al. Why do older sprinters reach the finish line later? *Exerc. Sport Sci. Rev.*, New York, v. 39, n. 1, p. 18-22, 2011.
- ASKARI, G. et al. Quercetin and vitamin C supplementation: effects on lipid profile and muscle damage in male athletes. *Int. J. Prev. Med.*, Isfahan, v. 4, n. Suppl 1, p. S58-62, 2013.
- ASSUMPÇÃO, C. O. et al. Exercise-induced muscle damage and running economy in humans. *The Scientific World Journal*, New York, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- BARASH, I. A. et al. Desmin cytoskeletal modifications after a bout of eccentric exercise in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Bethesda, v. 283, n. 4, p. R958-63, 2002.
- BASSIT, R. A. et al. Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 108, n. 5, p. 945-55, 2010.
- BELL, P. G. et al. Montmorency tart cherry (*Prunus cerasus* L.) concentrate lowers uric acid, independent of plasma cyaniding-3-O-glucosiderutinoside. *J. Funct. Foods*, S.I., v. 11, p. 82-90, 2014a.
- BELL, P. G. et al. The role of cherries in exercise and health. *Scan. J. Med. Sci. Sports*, Copenhagen, v. 24, n. 3, p. 477-9, 2014b.
- BELL, P. G. et al. Recovery facilitation with Montmorency cherries following high-intensity, metabolically challenging exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 414-23, 2015.
- BELLI, T.; CRISP, A.H.; VERLENGIA, R. Greater muscle damage in athletes with ACTN3 R577X (RS1815739) gene polymorphism after an ultra-endurance race: a pilot study. *Biol. Sport*, Warsaw, v. 34, n. 2, p. 105-10, 2017.

BLANCHARD, A.; OHANIAN, V.; CRITCHLEY, D. The structure and function of alpha-actinin. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, London, v. 10, n. 4, p. 280-9, 1989.

BOSCO, C. G. et al. Relationship between the efficiency of muscular work during jumping and the energetics of running. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 56, n. 2, p. 138-43, 1987.

BOURDIN, M et al. Effect of vertical loading on energy cost and kinematics of running in trained male subjects. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 79, n. 6, p. 2078-85, 1995.

BOWTELL, J. L. et al. Montmorreny cherry juice reduced muscle damage caused by intensive strength exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 43, n. 8, p. 1544-51, 2011.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F. M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br. Med. Bull.*, London, v. 81, p. 209-30, 2007.

BRAUN, W. A.; DUTTO, D. J. The effects of a single bout of downhill running and ensuing delayed onset of muscle soreness on running economy performed 48 h later. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 90, n. 1-2, p. 29-34, 2003.

BRAUN, W.; PAULSON, S. The effects of a downhill running bout on running economy. *Res. Sports. Med.*, Philadelphia, v. 20, n 3-4, p. 274-85, 2012.

BROCKET, C. L.; MORGAN, D. L.; PROSKE, U. Human hamstring muscles adapt to eccentric exercise by changing optimum length. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 33, n. 5, p. 783-90, 2001.

BURT, D. et al. Effects of repeated bouts of squatting exercise on sub-maximal endurance running performance. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 113, n. 2, p. 285-93, 2013.

CAVAGNA, G. A.; SAIBENE, F. P.; MARGARIA, R. Mechanical work in running. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 19, p. 249-56, 1964.

CAVANAGH, P. R.; WILLIAMS, K. R. The effect of stride length variation on oxygen uptake during distance running. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 14, n. 1, p. 30-5, 1982.

CHAZAUD, N. et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, New York, v. 37, n. 1, p. 18-22, 2009.

CHEN, T. C. et al. Changes in running economy following downhill running. *J. Sports Sci.*, London, v. 25, n. 1, p. 55-63, 2007.

CHEN, T. C. et al. Changes in running economy at different intensities following downhill running. *J. Sports Sci.*, London, v. 27, n. 11, p. 1137-44, 2009.

CHEN, T. C. et al. Comparison in eccentric exercise-induced muscle damage among four limb muscles. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 111, n. 2, p. 211-23, 2011a.

- CHEN, C. H. et al. Effects of flexibility training on eccentric exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 43, n. 3, p. 491-500, 2011b.
- CHEN, H. L. et al. Two maximal isometric contractions attenuate the magnitude of eccentric exercise-induced muscle damage. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, Ottawa, v. 37, n. 4, p. 680-9, 2012a.
- CHEN, T. C. et al. Attenuation of eccentric exercise-induced muscle damage by preconditioning exercises. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 44, n. 11, p. 2090-8, 2012b.
- CHEN, T. C. et al. Effect of two maximal isometric contractions on eccentric exercise-induced muscle damage of the elbow flexors. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 113, n. 6, p. 1545-54, 2013.
- CHEN, C. H. et al. Acute effects of static active or dynamic active stretching on eccentric-exercise-induced hamstrings muscle damage. *Int. J. Sports Physiol. Perform.*, S.I., v. 10, n. 3, p. 346-52, 2015.
- CLARKSON, P. M. et al. Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric, and concentric exercise. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v. 7, n. 3, p. 152-5, 1986.
- CLARKSON, P. M.; TREMBLAY, I. Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 65, n. 1, p. 1-6, 1988.
- CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, Baltimore, v. 81, n. 11, p. S52-69, 2002.
- CLARKSON, P. M. et al. ACTN3 and MLCK genotype associations with exertional muscle damage. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 99, n. 2, p. 564-9, 2005.
- CONNOLLY, D. A. et al. Efficacy of a tart cherry juice blend in preventing the symptoms of muscle damage. *Br. J. Sports Med.*, Loughborough, v. 40, n. 8, p. 679-683, 2006.
- COYLE, E. F. et al. Determinants of endurance in well-trained cyclists. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 64, n. 6, p. 2622-30, 1988.
- DALLEAU, G. et al. The spring-mass model and the energy cost of treadmill running. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, Berlin, v. 77, n. 3, p. 257-63, 1998.
- DAMAR, I.; EKŞİ, A. Antioxidant capacity and anthocyanin profile of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) juice. *Food Chem.*, Barking, v. 135, n. 4, p. 2910-4, 2012.
- DAMAS, F et al. Susceptibility to exercise-induced muscle damage: a cluster analysis with a large sample. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v. 37, n. 8, p. 633-40, 2016.

- DEL COSO, J. et al. ACTN3 X-allele carriers had greater levels of muscle damage during a half-ironman. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 117, n. 1, p. 151-58, 2017a.
- DEL COSO, J. et al. ACTN3 genotype influences exercise-induced muscle damage during a marathon competition. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 117, n. 3, p. 409-16, 2017b.
- DELLING, U. et al. A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol. Cell Biol.*, Washington, v. 20, n. 17, p. 6600-11, 2000.
- DENADAI, B. S. et al. Explosive training and heavy weight training are effective for improving running economy in endurance athletes: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med.*, Auckland, v. 47, n. 3, p. 545-54, 2017.
- DIAS, J.A. et al. Validity of two methods for estimation of vertical jump height. *J. Strength Cond. Res.*, Lincoln, v. 25, n. 7, p. 2034-2039, 2011.
- DRUZHEVSKAYA, A. M. et al. Association of the ACTN4 R577X polymorphism with power athlete status in Russians. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 103, n. 6, p. 631-4, 2008.
- EYNON, N. et al. ACTN3 R577X polymorphism and Israeli top-level athletes. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v. 30, n. 9, p. 695-8, 2009.
- FEBBRAIO, M. A. et al. Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J. Physiol.*, London, v. 549, n. Pt2, p. 607-12, 2003.
- FLETCHER, J. R.; ESAU, S. P.; MACINTOSH, B. R. Economy of running: beyond the measurement of oxygen uptake. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 107, n. 6, p. 1918-22, 2009.
- FRANCIS, K. Delayed muscle soreness: a review. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, Washington, v. 5, n. 1, p. 10-3, 1983.
- FRIEDLANDER, S. M. et al. ACTN3 allele frequency in humans covaries with global latitudinal gradient. *PLoS One*, San Francisco, v. 8, n. 1, 2013.
- FROST, G. et al. Explaining the differences in the metabolic cost and efficiency of treadmill locomotion in children. *J. Sports Sci.*, London, v. 20, n. 6, p. 451-61, 2002.
- GABBE, B. J. et al. A pilot randomised controlled trial of eccentric exercise to prevent hamstring injuries in community-level Australian Football. *J. Sci. Med. Sport*, Belconnen, v. 9, n. 1, p. 103-9, 2006.
- GISSSEL, H. The role of Ca<sup>2+</sup> in muscle cell damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 1066, p. 166-80, 2005.
- GLEESON, N. et al. Effects of prior concentric training on eccentric exercise induced muscle damage. *Br. J. Sports Med.*, Loughborough, v. 37, n. 2, p. 119-125, 2003.

GOLDFARB, L. G. et al. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeleton myopathy. *Nat. Genet.*, New York, v. 19, n. 4, p. 402-3, 1998.

GREEN, L. A.; PARRO, J. J.; GABRIEL, D. A. Quantifying the familiarization period for maximal resistive exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, Ottawa, v. 39, n. 3, p. 275-81, 2014.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 91, n. 2, p. 534-51, 2001.

HEAD, S. I. et al. Altered  $\text{Ca}^{2+}$  kinetics associated with alpha-actinin-3 deficiency may explain positive selection for ACTN3 null allele in human evolution. *PLoS Genet.*, San Francisco, v. 11, n. 1, 2015.

HICKS, K. M. et al. Muscle damage following maximal eccentric knee extensions in males and females. *PLoS One*, San Francisco, v. 11, n. 3, 2016.

HIROSE, L. et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc. Immunol. Rev.*, Champaign, v. 10, p. 75-90, 2004.

HOOBKAMER, W. et al. Altered running economy directly translates to altered distance-running performance. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 48, n. 11, p. 2175-80, 2016.

HOWATSON, G.; VAN SOMEREN, K. A. Evidence of a contralateral repeated bout effect after maximal eccentric contractions. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 101, n. 2, p. 207-14, 2007.

HOWATSON, G.; VAN SOMEREN, K. A. The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.*, Auckland, v. 38, n. 6, p. 483-503, 2008.

HOWATSON, G. et al. Influence of tart cherry juice on indices of recovery following marathon running. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, Copenhagen, v. 20, n. 6, p. 843-52, 2010.

HUBAL, M. J. et al. Inflammatory gene changes associated with the repeated bout effect. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Bethesda, v. 294, n. 5, p. R1628-37, 2008.

HUNTER, G. R. et al. Muscle metabolic economy is inversely related to exercise intensity and type II myofiber distribution. *Muscle Nerve*, Boston, v. 24, n. 5, p. 654-61, 2001.

HUNTER, G. R. et al. Tendon length and joint flexibility are related to running economy. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 43, n. 8, p. 1492-9, 2011.

HYDAHL, R. D.; CHEN, T. C.; NOSAKA, K. Mechanisms and mediators of the skeletal muscle repeated bout effect. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, New York, v. 45, n. 1, p. 24-33, 2017.

IAIA, F. M. et al. Four weeks of speed endurance training reduces energy expenditure during exercise and maintains muscle oxidative capacity despite a reduction in training volume. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 106, n. 1, p. 73-80, 2009.

JACOB, R. A. et al. Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 133, n. 6, p. 1826-9, 2003.

KAY, A. D.; BLAZEVIČH, A. J. Isometric contraction reduce plantar flexor moment, Achilles tendon stiffness, and neuromuscular activity but remove the subsequent effects of stretch. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 107, n. 4, p. 1181-9, 2009.

KELLEY, D. S. et al. Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 136, n. 4, p. 981-6, 2006.

KIKUCHI, N. et al. Association between ACTN3 R577X polymorphism and trunk flexibility in 2 different cohorts. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v. 38, n. 5, p. 4002-6, 2017.

KIM, J. H. et al. Genetic associations of body composition, flexibility and injury risk with ACE, ACTN3 and COL5A1 polymorphisms in Korean ballerinas. *J. Exerc. Nutrition Biochem.*, S.I., v. 18, n. 2, p. 205-14, 2014.

KOH, T. J.; BROOKS, S. V. Lengthening contractions are not required to induce protection from contraction-induced muscle injury. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Bethesda, v. 281, n. 1, p. R155-61, 2001.

KOH, T. J. et al. Passive stretches protect skeletal muscle of adult and old mice from lengthening contraction-induced injury. *A. Biol. Sci. Med. Sci.*, Washington, v. 58, n. 7, p. 592-7, 2003.

KRAM, R.; TAYLOR, R. Energetics of running: a new perspective. *Nature*, London, v. 346, n. 6281, p. 863-70, 1990.

KUEHL, K. S. et al. Efficacy of tart cherry juice in reducing muscle pain during running: a randomized controlled trial. *J. Int. Soc. Sports Nut.*, Woodland Park, v. 7, n. 17, p. 1-6, 2010.

KUEHL, K. S. Cherry juice targets antioxidant potential and pain relief. *Med. Sport. Sci.*, S.I., v. 59, p. 86-93, 2012.

LACOUR, J. R. et al. The energetics of middle-distance running. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, Berlin, v. 60, n. 1, p. 38-43, 1990.

LACOUR, J. R.; BOURDIN, M. Factor affecting the energy cost of level running at submaximal speed. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 115, n. 4, p. 651-73, 2015.

LACOURPAILLE, L. Time-course effect of exercise-induced muscle damage on localized muscle mechanical properties assessed using elastography. *Acta Physiol.*, Oxford, v. 211, n. 1, p. 135-46, 2014.

LAPIER, T. K. et al. Alterations in intramuscular connective tissue after limb casting affect contraction-induced muscle injury. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 78, n. 3, p. 1065-9, 1995.

LAZZER, S. et al. Factors affecting metabolic cost of transport during a multi-stage running race. *J. Exp. Biol.*, London, v. 217, n. Pt 5, p. 787-95, 2014.

LEE, F. X. et al. How does  $\alpha$ -actinin-3 deficiency alter muscle function? Mechanistic insights into ACTN, the 'gene for speed'. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1863, n. 4, p. 686-93, 2016.

LEHTI, M. et al. Effects of fatiguing jumping exercise on mRNA expression of titin-complex proteins and calpains. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 106, n. 4, p. 1419-24, 2009.

LEOPARDI, J. P. **Influência do método de avaliação no diagnóstico da dor muscular de início tardio após a corrida em declive.** 2014. 27 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Educação Física) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2014.

LIEBER, R. L.; THORNELL, L. E.; FRIDEN, J. Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 80, n. 1, p. 278-84, 1996.

LIMA, L. C.; DENADAI, B. S. The repeated bout effect: a comparison between upper and lower limbs. *Motriz*, Rio Claro, v.17, n. 4, p. 728-47, 2011.

LINDSTEDT, S. L.; LaSTAYO, P. C.; REICH, T. E. When active muscles lengthen: properties and consequences of eccentric contractions. *New Physiol. Sci.*, Maryland, v. 16, p. 256-61, 2001.

MacARTHUR, D. G. et al. Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. *Nat. Genet.*, New York, v. 39, n. 10, p. 1261-5, 2007.

MACKEY, A. L. et al. Sequenced response of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle. *FASEB J.*, Bethesda, v. 25, n. 6, p. 1943-59, 2011.

MARIÁN, V. et al. Improved maximum strength, vertical jump and sprint performance after 8 weeks of jump squat training with individualized loads. *J. Sports Sci. Med.*, S.I., v. 15, n. 3, p. 492-500, 2016.

MASTALOUDIS, A. et al. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free. Radic. Biol. Med.*, New York, v. 36, n. 10, p. 1329-41, 2004.

MATSUKAWA, A. et al. Chemokines and innate immunity. *Rev. Immunogenet.*, Copenhagen, v. 2, n. 3, p. 339-58, 2000.

McARDLE, A. et al. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, Bethesda, v. 280, n. 3, p. C621-7, 2001.



- McARDLE, F. et al. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. *J. Physiol.*, London, v. 15, n. Pt1, p. 233-44, 2004.
- McHUGH, M. P. et al. The role of passive muscle stiffness in symptoms of exercise-induced muscle damage. *Am. J. Sports Med.*, Baltimore, v. 27, n. 5, p. 594-9, 1999.
- McHUGH, M. P. et al. Electromyographic analysis of repeated bouts of eccentric exercise. *J. Sports Sci.*, London, v. 19, n. 3, p. 163-70, 2001.
- McHUGH, M. P. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, Copenhagen, v. 13 n. 2, p. 88-97, 2003.
- McLEAY, Y. et al. Effect of New Zealand blueberry consumption on recovery from eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, Woodland Park, v. 9, n. 1, p. 19, 2012.
- McMAHON, T. A.; CHENG, G. C. The mechanics of running: how does stiffness couple with speed? *J. Biomech.*, Elmsford, v. 23, n. Supple 1, p. 65-78, 1990.
- MILLET, G. P. et al. Effects of concurrent endurance and strength training on running economy and VO<sub>2</sub> kinetics. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 34, n. 8, p. 1351-9, 2002.
- MILLS, M. et al. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 10, n.13, p. 1335-1346, 2001.
- MOJOCK, C. D. et al. The effects of static stretching on running economy and endurance performance in female distance runners during treadmill running. *J. Strength Cond. Res.*, Lincoln, v. 25, n. 8, p. 2179-6, 2011.
- MORGAN, D. et al. Effect of step length optimization on the aerobic demand of running. *J. Appl. Physiol.*, Washington a, v. 77, n. 1, p. 245-51, 1994.
- MORGAN, D. L.; PROSKE, U. Popping sarcomere hypothesis explains stretch-induced muscle damage. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, Oxford, v. 31, n. 8, p. 541-5, 2004.
- NIEMAN, D. C. et al. Immune and oxidative changes during and following the Western States Endurance Run. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v. 24, n. 7, p. 541-7, 2003.
- NORTH, K. N. et al. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. *Nat. Genet.*, New York, v. 21, n. 4, p. 353-4, 1999.
- NOSAKA, K.; CLARKSON, P. M. Influence of previous concentric exercise on eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Sports Sci.*, London, v. 15, n. 5, p. 477-83, 1997.
- NOSAKA, K. et al. The repeated bout effect of reduced-load eccentric exercise on elbow flexor muscle damage. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 85, n. 1-2, p. 34-40, 2001a.

NOSAKA, K. et al. How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 33, n. 9, p. 1490-5, 2001b.

NOSAKA, K.; NEWTON, M. Concentric or eccentric training effect on eccentric exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison n, v. 34, n. 1, p. 63-9, 2002.

NOSAKA, K. et al. Partial protection against muscle damage by eccentric actions at short muscle lengths. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 37, n. 5, p. 746-53, 2005.

NOSAKA, K.; SACCO, P.; MAWATARI, K. Effects of amino acid supplementation on muscle soreness and damage. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, Champaign, v. 16, n. 6, p. 620-35, 2006.

NOSAKA, K. et al. Attenuation of muscle damage by preconditioning with muscle hyperthermia 1-day prior to eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 99, n. 2, p. 183-192, 2007.

NUMMELA, A.; KERÄNEN, T.; MIKKELSSON, L. O. Factors related to top running speed and economy. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v. 28, n. 8, p. 655-61, 2007.

PADILLA, S. et al. Physiological correlated of middle-distance running performance. A comparative study between men and women. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, Berlin, v. 65, n. 6, p. 561-6, 1992.

PASCHALIS, Y. K. et al. The effects of muscle damage on running economy in healthy males. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v. 26, n. 10, p. 827-31, 2005.

PASQUA, L. A. et al. ACTN3 e desempenho esportivo: um gene candidato ao sucesso em provas de curta e longa duração. *Rev. Bras. Cineantrop. Des. Hum.*, Florianópolis, v. 13, n. 6, p. 477-83, 2011.

PASQUA, L. A. et al. The genetics of human running: ACTN3 polymorphism as an evolutionary tool improving the energy economy during locomotion. *Ann. Hum. Biol*, London, v. 6, p. 1-6, 2015.

PATE, R. R. et al. Physiological, anthropometric, and training correlates of running economy. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 24, n. 10, p. 1128-33, 1992.

PEAKE, J.; NOSAKA, K.; SUZUKI, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc. Immunol. Rev.*, Champaign, v. 11, p. 64-85, 2005.

PEDERSEN, B. K. et al. Role of myokines in exercise and metabolism. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 103, n. 3, p. 1093-8, 2007.

PILLON, N. J. et al. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, Bethesda, v. 304, n. 5, p. E453-65, 2013.

- PIMENTA, E. M. et al. The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v. 112, n. 4, p. 1495-1503, 2012.
- PINNINGTON H. C.; DAWNSON, B. The energy cost of running on grass compared to soft dry beach sand. *J. Sci. Med. Sport*, Belconnen, v. 4, n. , p. 416-30, p. 416-30, 2001.
- PERL, D. P.; DAOUD, A. I.; LIEBERMAN, D. E. Effects of footwear and strike type on running economy. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 44, n. 7, p. 1335-43, 2012.
- PIZZA, F. X. et al. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions in mice. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 92, n. 5, p. 187-8, 2002.
- PIZZA, F. X. et al. Neutrophils contribute to muscle injury and impairs its resolution after lengthening contractions in mice. *J. Physiol.*, London, v. 562, n. 3, p. 899-913, 2005.
- PRADO, L. G. et al. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J. Gen. Physiol.*, S.I., v. 126, n. 5, p. 461-80, 2005.
- QUINLAN, K. G. et al. Alpha-actinin-3 deficiency results in reduced glycogen phosphorylase activity and altered calcium handling in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 19, n. 7, p. 1335-46, 2010.
- REBELLO, C. J.; GREENWAY, F. L.; FINLEY, J. W. Whole grains and pulses: a comparison of the nutritional and health benefits. *J. Agric. Food. Chem.*, Washington, v. 62, n. 29, p. 7029-49, 2014.
- ROBERTS, T. J. et al. Energetics of bipedal running. I. Metabolic cost of generating force. *J. Exp. Biol.*, London, v. 201, n. Pt 19, p. 2745-51, 1998.
- SACCO, I. C. et al. Ground reaction force in basketball cutting maneuvers with and without ankle bracing and taping. *São Paulo Med. J.*, São Paulo, v. 124, n. 5, p. 245-252, 2006.
- SAHALY, R. et al. Maximal voluntary force and rate of force development in humans – importance of instruction. *Eur. J. Appl. Physiol.*. Berlin, v. 85, n. 2-4, p. 345-50, 2001.
- SANTOS, R. V. et al. The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30k race. *Life Sci.*, Oxford, v. 75, n. 16, p. 1917-24, 2004.
- SARIC, A. et al. Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mice consuming sour cherry juice (*Prunus cerasus* cv. Maraska). *Plant Foods Hum. Nutr.*, Dordrecht, v. 64, n. 4, p. 231-7, 2009.
- SAUNDERS, P.U. et al. Factors affecting running economy in trained distance runners. *Sports Med.*, Auckland, v. 34, n. 7, p. 465-85, 2004.

- SAUNDERS, P. et al. Short-term plyometric training improves running economy in highly trained middle and long distance runners. *J. Strength Cond. Res.*, Lincoln, v. 20, n. 4, p. 947-54, 2006.
- SEERAM, N. P. et al. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyaniding glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, Stuttgart, v. 8, n. 5, p. 362-9, 2001.
- SELCEN, D.; ENGEL, A. G. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann. Neurol.*, Boston, v. 57, n. 2, p. 269-76, 2005.
- SETO, J. T. et al. Deficiency of alpha-actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 20, n. 15, p. 2914-27, 2011.
- SETO, J. T. et al. ACTN3 genotype influences muscle performance through the regulation of calcineurin signaling. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 123, n. 10, p. 4255-63, 2013.
- SHAW, A. J. et al. The reliability of running economy expressed as oxygen cost and energy cost in trained distance runners. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, Ottawa, v. 38, n. 12, p. 1268-72, 2013.
- SHAW, A. J.; INGHAM, S. A.; FOLLAND, J. P. The valid measurement of running economy in runners. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 46, n. 10, p. 1968-73, 2014.
- SILVEIRA, E. M. et al. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. *Cell. Biochem. Funct.*, Chichester, v. 25, n. 1, p. 63-73, 2007.
- STØREN, O. et al. Maximal strength training improves running economy in distance runners. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Madison, v. 40, n. 6, p. 1087-92, 2008.
- TARTARUGA, M. P. et al. The relationship between running economy and biomechanical variables in distance runners. *Res. Q. Exerc. Sport*, Washington, v. 83, n. 3, p. 367-75, 2012.
- THOMAS, D. Q.; FERNHALL, B. O.; GRANAT, H. Changes in running economy during a 5-km run in trained men and women runners. *J. Strength Cond. Res.*, Lincoln, v. 13, n. 2, p. 162-7, 1999.
- TOURSEL, T. et al. Passive tension of rat skeletal soleous muscle fibers: effects of unloading conditions. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 92, n. 4, p. 1465-72, 2002.
- TRAUSTADÓTTIR, T. et al. Tart cherry juice decreases oxidative stress in healthy older men and women. *J. of Nutr.*, Philadelphia, v. 139, n. 10, p. 1896-900, 2009.
- TRICOLI, W. Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. *Rev. Bras. Ciên. Mov.*, Brasilia, v. 9, n. 2, p. 39-44, 2001.
- TSKHOVREBOVA, L.; TRINICK, L. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *J. Biomed. Biotechnol.*, S.I., v. 2010, p. 1-7, 2010.

- TURNER, A. M.; OWINGS, M.; SCHWANE, J. A. Improvement in running economy after 6 weeks of plyometric training. *J. Strength Cond. Res.*, Lincoln, v. 17, n. 1, p. 60-7, 2003.
- VAN ACKER, S. A. et al. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 214, n. 3, p. 755-9, 1995.
- VASSILIS, B. et al. Isokinetic eccentric exercise of quadriceps femoris does not affect running economy. *J. Strength Cond. Res.*, Lincoln, v. 22, n. 4, p. 1222-7, 2008
- VENCKUNAS, T. et al. Human alpha-actinin-3 genotype association with exercise-induced muscle damage and the repeated-bout effect. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, Ottawa, v. 37, n. 6, p. 1038-46, 2012.
- VERBOURG, E. et al. Disruption of excitation-contraction coupling and titin by endogenous Ca<sup>2+</sup>-activated proteases in toad muscle fibres. *J. Physiol.*, London, v. 564, n. 3, p. 775-90, 2005.
- VICART, P. et al. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat. Genet.*, New York, v. 20, n. 1, p. 92-5, 1998.
- VINCENT, B. et al. Protective role of  $\alpha$ -actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 109, n. 2, p. 564-73, 2010.
- VIREL, A.; BACKMAN, L. Molecular evolution and structure of alpha-actinin. *Mol. Biol. Evol.*, Chicago, v. 21, n. 6, p. 1024-31, 2004.
- VORGERD, M. et al. A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, Chicago, v. 77, n. 2, p. 297-304, 2005.
- WANG, H. et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding, from tart cherries. *J. Nat. Prod.*, Cincinnati, v. 62, n. 2, p. 294-6, 1999.
- WANG, J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agricult. Food Chem.*, Barking, v. 50, n. 15, p. 4183-9, 2002.
- WILLIAMS, K. R.; CAVANAGH, P. R. Relationship between running distance mechanics, running economy, and performances. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 63, n. 3, p. 1236-45, 1987.
- XIN, L. et al. A contralateral repeated bout effect attenuates induction of NF-kB DNA binding following eccentric exercise. *J. Appl. Physiol.*, Washington, v. 116, n. 11, p. 1473-80, 2014.
- YANG, N. et al. ACTN3 genotype is associated with human elite performance. *Am. J. Hum. Genet.*, Chicago, v. 73, n. 3, p. 627-31, 2003.

## **APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO I**

### ***TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - (TCLE)*** **(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12)**

Eu, Leonardo Coelho Rabello de Lima, RG 44.991.618-2, aluno do Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento Humano e Tecnologias, tendo como orientador o Prof. Dr. Benedito Sérgio Denadai, convido o Sr. para participar de uma pesquisa que será desenvolvida na UNESP, como parte das atividades de meu Doutorado, com o seguinte título: “Relação entre economia de corrida e força muscular: análise pelo modelo de dano muscular induzido pela corrida em declive”. O objetivo desta pesquisa é investigar a relação existente entre o gasto energético para se correr em uma velocidade constante e a força que os músculos da perna produzem, por meio de um modelo de corrida em declive.

Vale informá-lo que toda pessoa que for realizar os testes terá acesso aos seus resultados, assim como poderá solicitar esclarecimentos, antes e durante a realização da pesquisa. Nenhum resultado será divulgado ou levado ao conhecimento de pessoas estranhas ao Laboratório de Avaliação da Performance Humana, garantindo que a sua participação no estudo seja anônima. Você poderá abandonar os testes a qualquer momento, sem prestar qualquer tipo de esclarecimento, e sem nenhum tipo de prejuízo. Você não terá nenhum tipo de despesa financeira durante a pesquisa e, portanto, não haverá necessidade de ressarcimento, sendo sua participação voluntária. Você terá sempre o acompanhamento e assistência de um membro do laboratório durante todos os testes que serão realizados e, caso haja qualquer dúvida, você pode questioná-lo a qualquer momento.

A duração total da pesquisa será de duas semanas, na primeira vez que você vier ao laboratório, serão apresentados para você o dinamômetro isocinético (aparelho que mede a sua força), a esteira de declive (descida) e a plataforma que mede a sua força no solo. Neste dia você conhecerá melhor os aparelhos, realizando alguns movimentos neles. Depois, você fará o teste para medir sua capacidade máxima em exercício aeróbico em esteira. Dois dias após essa sessão, você voltará ao laboratório para realizar outra adaptação aos aparelhos de medição de força. Por fim, você voltará ao laboratório na semana seguinte, por cinco dias seguidos.

No primeiro dia você realizará alguns testes de força e corrida antes e após uma sessão de corrida em descida na esteira. A corrida em descida terá a duração de 30 minutos. Os mesmos testes realizados antes e após a corrida em descida serão realizados nos 5 dias seguintes. Você poderá fazer parte de 4 diferentes grupos nessa pesquisa. Dois desses grupos vão consumir dois tipos diferentes de suplementos (concentrado ou placebo) duas vezes por dia nos sete dias que antecederem a corrida em declive, no dia da corrida, e nos cinco dias seguintes. O terceiro grupo fará 10 contrações máximas em um aparelho de musculação dois dias antes da corrida em declive. E o quarto grupo fará as mesmas 10 contrações além de consumir um dos suplementos (concentrado) já citados. Os testes a serem realizados antes e cinco dias após a corrida em declive serão explicados a seguir

O primeiro teste a ser realizado, será o de economia de corrida. Este terá a duração de oito minutos, e será feito em uma velocidade calculada baseada nos valores obtidos no teste de capacidade máxima aeróbia. Durante o oitavo minuto será feita uma filmagem em vídeo apenas de suas pernas, para depois serem feitas medidas do comprimento e frequência da sua passada.

Para determinar a força que você consegue realizar com os músculos da sua coxa, será utilizado o aparelho ao qual você estará adaptado. Será avaliada a sua capacidade de estender (músculos da parte da frente da coxa) o joelho. Após isso, serão realizadas medidas da circunferência da sua coxa, assim como os ângulos de flexão (dobrar) e extensão (estender) máximas do seu joelho. Você também realizará dois tipos saltos em uma plataforma de força.

Para medir a dor muscular, serão realizados quatro testes: O teste da palpação, no qual você será orientado a massagear a musculatura da sua coxa; O teste de sentar e levantar, em que você deve se sentar em um banco de 25 cm, apoiando as costas no encosto da cadeira, e se levantar sem ajuda das mãos; O teste do step, em que você será orientado a subir e descer, pé sobre pé, em um step; E o teste de movimento passivo no dinamômetro no qual o aparelho estenderá e dobrará a sua perna de 3 a 5 vezes. Após cada um desses testes, você deverá preencher uma escala de análogos visuais (EAV), que consiste em uma reta contínua de 100mm, de início (0mm) com os dizeres "Sem dor", e fim (100mm) com os dizeres "Muita, muita dor". E, por fim, a última coleta a ser realizada será a extração de uma quantidade de 0,5 ml de sangue do lóbulo da sua orelha. Para isso, um dos pesquisadores passará uma pomada que facilita a extração de sangue no lóbulo da sua orelha e deixará reagir por 5 minutos. Após isso, será realizada uma pequena perfuração no lóbulo da sua orelha, e o sangue será coletado e congelado para a análise.

É necessário informá-lo dos riscos e benefícios que envolvem esta pesquisa. Sendo assim, segue abaixo algumas considerações:

O que se observa com maior frequência devido à corrida em declive são dores nas pernas e glúteos, que acontecem por causa de um processo inflamatório controlado. Também poderá ocorrer um inchaço na região das

coxas devido ao mesmo processo inflamatório já citado. É recomendado que, durante os dias de treino, você beba bastante água, para que esses sintomas sejam evitados, e para ajudar os rins a filtrarem certas substâncias, evitando assim riscos nestes órgãos.

Os riscos presentes nas sessões dos testes de corrida, por envolver a utilização da esteira rolante, são possíveis lesões musculares, traumatismos em geral, arritmias cardíacas, mudanças repentinas na pressão arterial e até, em casos raros, ataques cardíacos, assim como inflamação e infecção devido à coleta de sangue no lóbulo da orelha. Porém, estes eventos ocorrem com baixa frequência nas condições laboratoriais. Além dos voluntários terem a chance de se adaptar ao uso da esteira, todos os procedimentos necessários de proteção e higiene para a coleta de sangue realizados pelos pesquisadores, como: utilização de luvas, avental e materiais descartáveis. Na ocorrência de algum acidente, os riscos tendem a ser minimizados pelas condições de pronto-atendimento e pelo chamado da Unidade de Resgate do Corpo de Bombeiros, com equipamentos médicos e motorista, auxiliar e encarregado, para a realização dos primeiros socorros. Caso necessário você será transportado por esta equipe para um hospital.

Os benefícios esperados e provenientes desse tipo de protocolo são um eventual efeito protetor contra dores e microlesões musculares conferido pela sessão de corrida em descida e o conhecimento de algumas variáveis importantes na aptidão física. Se você sentir-se suficientemente esclarecido sobre essa pesquisa, seus objetivos, eventuais riscos e benefícios, convido-o a assinar este Termo, elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com o Sr. e outra com o pesquisador.

#### **DADOS DA PESQUISA**

Título do projeto: Relação entre economia de corrida e força muscular: análise pelo modelo de dano muscular induzido pela corrida em declive

Pesquisador Responsável: Leonardo Coelho Rabello de Lima

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- Campus de Rio Claro

Endereço: Rua 3, 2053 (frente), Centro, Rio Claro - SP

Fone: (19) 99668-5358

e-mail: [leonardocrlima@gmail.com](mailto:leonardocrlima@gmail.com)

Orientador: Benedito Sérgio Denadai

Cargo/função: Professor titular

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro

Endereço: Avenida 24-A, 1313, Bela Vista, Rio Claro – SP

Fone: (19) 3526-4325

e-mail: [bdenadai@rc.unesp.br](mailto:bdenadai@rc.unesp.br)

#### **CEP-IB/UNESP-CRC**

Av. 24A, nº 1515 – Bela Vista – 13506-900 – Rio Claro/SP

Telefone: (19) 35269678

#### **Dados sobre o participante da Pesquisa:**

Nome: \_\_\_\_\_

Documento de Identidade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Voluntário

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Orientador

## **APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO II**

### ***TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - (TCLE)*** **(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12)**

Eu, Leonardo Coelho Rabello de Lima, RG 44.991.618-2, aluno do Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento Humano e Tecnologias, tendo como orientador o Prof. Dr. Benedito Sérgio Denadai, convido o Sr. para participar de uma pesquisa que será desenvolvida na UNESP, como parte das atividades de meu Doutorado, com o seguinte título: “Relação entre economia de corrida e força muscular: análise pelo modelo de dano muscular e polimorfismo do gene ACTN3”. O objetivo desta pesquisa é investigar a relação existente entre o gasto energético para se correr em uma velocidade constante e a força que os músculos da perna produzem, por meio de um modelo de corrida em declive e das diferenças genéticas de cada indivíduo.

Vale informá-lo que toda pessoa que for realizar os testes terá acesso aos seus resultados, assim como poderá solicitar esclarecimentos, antes e durante a realização da pesquisa. Nenhum resultado será divulgado ou levado ao conhecimento de pessoas estranhas ao Laboratório de Avaliação da Performance Humana, garantindo que a sua participação no estudo seja anônima. Você poderá abandonar os testes a qualquer momento, sem prestar qualquer tipo de esclarecimento, e sem nenhum tipo de prejuízo. Você não terá nenhum tipo de despesa financeira durante a pesquisa e, portanto, não haverá necessidade de ressarcimento, sendo sua participação voluntária. Você terá sempre o acompanhamento e assistência de um membro do laboratório durante todos os testes que serão realizados e, caso haja qualquer dúvida, você pode questioná-lo a qualquer momento.

A duração total da pesquisa será de duas semanas, na primeira vez que você vier ao laboratório, serão apresentados para você o dinamômetro isocinético (aparelho que mede a sua força), a esteira de declive (descida) e a plataforma que mede a sua força no solo. Neste dia você conhecerá melhor os aparelhos, realizando alguns movimentos neles. Depois, você fará o teste para medir sua capacidade máxima em exercício aeróbio em esteira. Dois dias após essa sessão, você voltará ao laboratório para realizar outra adaptação aos aparelhos de medição de força e terá 5 ml de sangue extraídos da sua veia por um profissional experiente da área de enfermagem. Por fim, você voltará ao laboratório na semana seguinte, por cinco dias seguidos.

No primeiro dia você realizará alguns testes de força e corrida antes e após uma sessão de corrida em descida na esteira. A corrida em descida terá a duração de 30 minutos. Os mesmos testes realizados antes e após a corrida em descida serão realizados nos 5 dias seguintes. Baseado na sua genética, você poderá fazer parte de dois diferentes grupos nessa pesquisa. Porém, ambos os grupos realizarão exatamente os mesmos testes antes e alguns dias após a corrida em descida. Todos os testes a serem realizados no laboratório serão explicados a seguir

O primeiro teste a ser realizado, será o de economia de corrida. Este terá a duração de oito minutos, e será feito em uma velocidade calculada baseada nos valores obtidos no teste de capacidade máxima aeróbia. Durante o oitavo minuto será feita uma filmagem em vídeo apenas de suas pernas, para depois serem feitas medidas do comprimento e frequência da sua passada.

Para determinar a força que você consegue realizar com os músculos da sua coxa, será utilizado o aparelho ao qual você estará adaptado. Será avaliada a sua capacidade de estender (músculos da parte da frente da coxa) o joelho. Após isso, serão realizadas medidas da circunferência da sua coxa, assim como os ângulos de flexão (dobrar) e extensão (estender) máximas do seu joelho. Você também realizará dois tipos saltos em uma plataforma de força.

Para medir a dor muscular, serão realizados quatro testes: O teste da palpação, no qual você será orientado a massagear a musculatura da sua coxa; O teste de sentar e levantar, em que você deve se sentar em um banco de 25 cm, apoiando as costas no encosto da cadeira, e se levantar sem ajuda das mãos; O teste do step, em que você será orientado a subir e descer, pé sobre pé, em um step; E o teste de movimento passivo no dinamômetro no qual o aparelho estenderá e dobrará a sua perna de 3 a 5 vezes. Após cada um desses testes, você deverá preencher uma escala de análogos visuais (EAV), que consiste em uma reta contínua de 100mm, de início (0mm) com os dizeres "Sem dor", e fim (100mm) com os dizeres "Muita, muita dor".

E, por fim, a última coleta a ser realizada será a extração de uma quantidade de 0,5 ml de sangue do lóbulo da sua orelha. Para isso, um dos pesquisadores passará uma pomada que facilita a extração de sangue no lóbulo da sua orelha e deixará reagir por 5 minutos. Após isso, será realizada uma pequena perfuração no lóbulo da sua orelha, e o sangue será coletado e congelado para a análise.

É necessário informá-lo dos riscos e benefícios que envolvem esta pesquisa. Sendo assim, segue abaixo algumas considerações:

O que se observa com maior frequência devido à corrida em declive são dores nas pernas e glúteos, que acontecem por causa de um processo inflamatório controlado. Também poderá ocorrer um inchaço na região das coxas devido ao mesmo processo inflamatório já citado. É recomendado que, durante os dias de treino, você beba



bastante água, para que esses sintomas sejam evitados, e para ajudar os rins a filtrarem certas substâncias, evitando assim riscos nestes órgãos.

Os riscos presentes nas sessões dos testes de corrida, por envolver a utilização da esteira rolante, são possíveis lesões musculares, traumatismos em geral, arritmias cardíacas, mudanças repentinas na pressão arterial e até, em casos raros, ataques cardíacos, assim como inflamação e infecção devido à coleta de sangue no lóbulo da orelha. Porém, estes eventos ocorrem com baixa frequência nas condições laboratoriais. Além dos voluntários terem a chance de se adaptar ao uso da esteira, todos os procedimentos necessários de proteção e higiene para a coleta de sangue serão realizados pelos pesquisadores, como: utilização de luvas, avental e materiais descartáveis. Na ocorrência de algum acidente, os riscos tendem a ser minimizados pelas condições de pronto-atendimento e pelo chamado da Unidade de Resgate do Corpo de Bombeiros, com equipamentos médicos e motorista, auxiliar e encarregado, para a realização dos primeiros socorros. Caso necessário você será transportado por esta equipe para um hospital.

Os benefícios esperados e provenientes desse tipo de protocolo são um eventual efeito protetor contra dores e microlesões musculares conferido pela sessão de corrida em descida e o conhecimento de algumas variáveis importantes na aptidão física, como a ausência ou presença de uma proteína utilizada para identificar talentos nas áreas de esporte e atividade física.

Se você sentir-se suficientemente esclarecido sobre essa pesquisa, seus objetivos, eventuais riscos e benefícios, convidado-o a assinar este Termo, elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com o Sr. e outra com o pesquisador.

#### **DADOS DA PESQUISA**

Título do projeto: Relação entre economia de corrida e força muscular: análise pelo modelo de dano muscular induzido pela corrida em declive

Pesquisador Responsável: Leonardo Coelho Rabello de Lima

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- Campus de Rio Claro

Endereço: Rua 3, 2053 (frente), Centro, Rio Claro - SP

Fone: (19) 99668-5358

e-mail: [leonardocrlima@gmail.com](mailto:leonardocrlima@gmail.com)

Orientador: Benedito Sérgio Denadai

Cargo/função: Professor titular

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro

Endereço: Avenida 24-A, 1313, Bela Vista, Rio Claro – SP

Fone: (19) 3526-4325

e-mail: [bdenadai@rc.unesp.br](mailto:bdenadai@rc.unesp.br)

#### **CEP-IB/UNESP-CRC**

Av. 24A, nº 1515 – Bela Vista – 13506-900 – Rio Claro/SP

Telefone: (19) 35269678

#### **Dados sobre o participante da Pesquisa:**

Nome: \_\_\_\_\_

Documento de Identidade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Voluntário

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Orientador

**APÊNDICE C – ESCALA DE ANÁLOGOS VISUAIS**

## **APÊNDICE D – DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse de nenhuma natureza para a condução dos estudos contidos na presente tese. Todos os materiais permanentes e de consumo foram adquiridos com verba de financiamento de órgãos públicos, assim como o custeio de taxas de revisão e publicação de artigos. As despesas com a apresentação de trabalhos em congressos também foram cobertas por órgãos públicos de fomento. Seguem descritos abaixo os números dos processos em órgãos de fomento que serviram de fomento para o presente projeto de pesquisa:

- 1) FAPESP: 2013/23585-4 – Bolsa de Doutorado no País (Leonardo Coelho Rabello de Lima)
- 2) FAPESP: 2016/04909-1 – Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (Leonardo Coelho Rabello de Lima)

As respectivas prestações de contas foram submetidas aos órgãos de fomento responsáveis juntamente a relatórios científicos periódicos, obtendo status de aprovado.

**ANEXO A – TESTES LABORATORIAIS DO SUCO ANTIOXIDANTE**

04/25/2014

Page 1 of 2

## Certificate of Analysis

**Customer: JUXX COMERCIO BEBIDAS****Sample Identification:**

Batch #: B-14142a

BL ID #: 14-0202

Description: ANTIOX JUICE, Liquid, TESTE ANTIOX 27/03/14

Date Received: 04/09/2014

**Results:**

Analysis	Result	Units
ORAC against peroxy radicals	26.03	µmole TE/milliliter
ORAC against hydroxyl radicals	85.00	µmole TE/milliliter
ORAC against peroxynitrite	2.22	µmole TE/milliliter
ORAC against super oxide anion	22.86	µmole TE/milliliter
ORAC against singlet oxygen	145.89	µmole TE/milliliter
ORAC 5.0 (sum of above)	282.00	µmole TE/milliliter

\* The acceptable precision of the ORAC assay is < 15% relative standard deviation.

There are five predominant reactive species found in the body: peroxy radicals, hydroxyl radicals, peroxynitrite, super oxide anion, and singlet oxygen. ORAC 5.0 provides a measure of the total antioxidant power of a food/nutrition product against the five predominant reactive species.

The ORAC result is expressed as micromole Trolox equivalency (µmole TE) per milliliter.

**Released on behalf of Brunswick Laboratories by**

Jin Ji, Ph.D.

Chief Technology Officer

**REFERENCES:**

- [1] Ou, B. *et al.*, *J Agric and Food Chem*, **2001**, 49 (10): 4619-4626.
- [2] Huang, D. *et al.*, *J Agric and Food Chem*, **2002**, 50 (7): 1815-1821.
- [3] Ou, B. *et al.*, *J Agric and Food Chem*, **2002**, 50 (10): 2772-2777.
- [4] Zhang, L. *et al.*, *Free Radic.Bio Med*, **2007**, 43 (suppl. 1): S17.
- [5] Dubost, N.J. *et al.*, *Food Chem*, **2007**, 105 (2): 727-735
- [6] Zhang, L. *et al.*, *J Agric and Food Chem*, **2009**, 57(7): 2661-2667.
- [7] Ou, B. *et al.*, Method for assaying the antioxidant capacity of a sample. *US Patent 7, 132, 296 B2*.

The results shown in this Certificate of Analysis refer only to the sample(s) tested, unless otherwise stated. Attention is drawn to the limitation of liability, indemnification, and jurisdictional issues. This Certificate of Analysis cannot be reproduced, except in full, without prior written permission of Brunswick Laboratories, Inc.. Any misrepresentation, unauthorized alteration, or falsification of the content or appearance of this Certificate of Analysis is unlawful. The Customer agrees and indemnifies Brunswick Laboratories, Inc., its officers, directors, employees, agents, (collectively referred to as Brunswick Labs) and agrees to hold them harmless from any claims, judgments, actions, or expenses of any kind, including attorneys' fees, in the event that Brunswick Labs takes action to correct any such misrepresentation, alteration, forgery, or falsification, understanding that such conduct by Customer or its employees or agents damages the reputation and therefore the business of Brunswick Labs. Such actions may include, without limitation, litigation or announcements to any component of or the entire relevant industry of such misbehavior, as described above.

**IMPROVING HEALTH THROUGH SCIENCE**

04/25/2014

Page 2 of 2

## Certificate of Analysis

**Customer: JUXX COMERCIO BEBIDAS****Sample Identification:**

Batch #: B-14142a

BL ID #: 14-0202

Description: ANTIOX JUICE, Liquid, TESTE ANTIOX 27/03/14

Date Received: 04/09/2014

**ORAC 5.0 Method Description:**

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) tests are among the most acknowledged methods that measure antioxidant scavenging activity against oxygen radicals that are known to be involved in the pathogenesis of aging and many common diseases. ORAC 5.0 consists of five types of ORAC assays that evaluate the antioxidant capacity of a material against five primary reactive oxygen species (ROSs, commonly called "oxygen radicals") found in humans: peroxy radical, hydroxyl radical, superoxide anion, singlet oxygen, and peroxynitrite. This is a comprehensive panel that evaluates the antioxidant capacity of a material against oxygen radicals

The ORAC 5.0 tests are based on evaluating the capacity of an interested material to protect a probe (a fluorescent probe or chromagen) from its damage by ROSs. In all ORAC assays, an ROS inducer is introduced to the assay system. The ROS inducer triggers the release of a specific ROS, which would degrade the probe and cause its emission wavelength or intensity change. When an antioxidant material presents in the environment, the antioxidant absorbs the ROS and preserves the probe from degradation. The degree of probe preservation indicates the antioxidant capacity of the material. Trolox is used as the reference standard, and the results are expressed as  $\mu$ mole Trolox equivalency per gram (or milliliter) of a tested material.

The ORAC 5.0 values obtained from various natural and synthetic materials range widely due to the significantly different natures of these materials including fresh produce, liquid, extract, pure compound, cream, or oil. Select ORAC 5.0 values of benchmark materials are listed in our website to provide limited scale. Comparisons between materials from similar categories are more informative and valuable.

---

The results shown in this Certificate of Analysis refer only to the sample(s) tested, unless otherwise stated. Attention is drawn to the limitation of liability, indemnification, and jurisdictional issues. This Certificate of Analysis cannot be reproduced, except in full, without prior written permission of Brunswick Laboratories, Inc.. Any misrepresentation, unauthorized alteration, or falsification of the content or appearance of this Certificate of Analysis is unlawful. The Customer agrees and indemnifies Brunswick Laboratories, Inc., its officers, directors, employees, agents, (collectively referred to as Brunswick Labs) and agrees to hold them harmless from any claims, judgments, actions, or expenses of any kind, including attorneys' fees, in the event that Brunswick Labs takes action to correct any such misrepresentation, alteration, forgery, or falsification, understanding that such conduct by Customer or its employees or agents damages the reputation and therefore the business of Brunswick Labs. Such actions may include, without limitation, litigation or announcements to any component of or the entire relevant industry of such misbehavior, as described above.

**IMPROVING HEALTH THROUGH SCIENCE**

04/23/2014

Page 1 of 1

## Certificate of Analysis

**Customer: JUXX COMERCIO BEBIDAS****Sample Identification:**

Batch #: B-14142b

Date Received: 04/09/2014

**Results:**

Description	BL ID	Analysis	Result	Units
ANTIOX JUICE, Liquid, TESTE	14-0202	<i>trans</i> -Resveratrol	187.06	µg/milliliter
ANTIOX 27/03/14		<i>cis</i> -Resveratrol	ND	µg/milliliter

This analysis is performed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Optimized method based on protocol described in the reference below is applied.

ND: Not Detected.

Limit of Detection: *cis*-resveratrol 0.1 µg/mL.

**Released on behalf of Brunswick Laboratories by**

Jin Ji, Ph.D.

Chief Technology Officer

**REFERENCES:**

- [1] S. Y. Wang, *et al.*, Resveratrol Content in Strawberry Fruit Is Affected by Preharvest Conditions. *J. Agri. Food Chem.* **2007**, *55*, 8269-8274.

The results shown in this Certificate of Analysis refer only to the sample(s) tested, unless otherwise stated. Attention is drawn to the limitation of liability, indemnification, and jurisdictional issues. This Certificate of Analysis cannot be reproduced, except in full, without prior written permission of Brunswick Laboratories, Inc.. Any misrepresentation, unauthorized alteration, or falsification of the content or appearance of this Certificate of Analysis is unlawful. The Customer agrees and indemnifies Brunswick Laboratories, Inc., its officers, directors, employees, agents, (collectively referred to as Brunswick Labs) and agrees to hold them harmless from any claims, judgments, actions, or expenses of any kind, including attorneys' fees, in the event that Brunswick Labs takes action to correct any such misrepresentation, alteration, forgery, or falsification, understanding that such conduct by Customer or its employees or agents damages the reputation and therefore the business of Brunswick Labs. Such actions may include, without limitation, litigation or announcements to any component of or the entire relevant industry of such misbehavior, as described above.

**IMPROVING HEALTH THROUGH SCIENCE**



# GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

## SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº: RE-CQ 03.883/14

REF PROPOSTA CCQA Nº 1318/14

INTERESSADO: Juxx Comercial de Bebidas Imp e Exp. Ltda

ENDEREÇO: Rua Bahia, 381-Barueri/SP

DATA DE RECEBIMENTO DA(S) AMOSTRA(S): 03/04/2014

DATA DE EMISSÃO: 23/04/2014

NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): Físico-química

### 1. DESCRIÇÃO DA(S) AMOSTRA(S)

RAM-CQ 2682/14 - Suco de Frutas - Antiox; Lote: Teste Antiox; Fabricação: 27/03/14; Validade: 27/03/15

### 2. MÉTODO(S)

#### Umidade e voláteis

MA-CQ.024 baseado em:

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. Chapter 37, met. 920.151, p. 06.

#### Cinzas

MA-CQ.015 baseado em:

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. Chapter 37, met. 940.26, p. 07.

#### Lipídios totais

MA-CQ.022 baseado em:

ZENEON, Odair; PASCUET, Neus Sadoco (coord). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde/ANVISA; São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. cap. 4, met. 034B, p. 119.

#### Proteína

MA-CQ.315 baseado em:

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. Chapter 37, met. 920.152, p. 10.

#### Fibra alimentar total

MA-CQ.075 baseado em:

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. Chapter 45, met. 985.29, p. 101-102.

#### Calorias

KALIL, A.. **Manual Básico de Nutrição**. São Paulo: Instituto de Saúde, 1975.

PASSMORE, R.; NICOL, B.M.; RAO, M.N. **Manual Sobre Necessidades Nutricionales Del Hombre**. Ginebre: O.M.S., 1975. (Série de Monografia, 61).

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Composition of Foods**. Agriculture Handbook Nº8, WASHINGTON; USDA, 1963.



CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS  
Av. Brasil, 2880 • CEP 13.070-178 • Campinas/SP • Brasil  
Tel. 19 3743-1781/1810/1786 • Fax 19 3242-4585  
email: ccqa@ital.sp.gov.br  
<http://www.ital.sp.gov.br>



1/3 *DF*



### Sódio, Potássio

MA-CQ.072 baseado em:

MORGANO, M.A.; QUEIROZ, S.C.N.; FERREIRA, M.C.; Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP OES). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 19, n. 3, p. 344-348, 1999.

### Ácido Ascórbico

MA-CQ.041 baseado em:

ARAKAWA, N.; OTSUKA, M.; KURATA, T.; INAGKI, C. Separative determination of ascorbic acid and erythorbic acid by high-performance liquid chromatography. *Journal Nutritional Science Vitaminology*, Japan, v. 27, p. 1-7, 1981.

### Antocianinas totais

MA-CQ.221 baseado em:

TEIXEIRA, L.N.; STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, F.A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Ceres*, Viçosa, v. 55, n. 4, p. 297-304, Jul/Ago., 2008.

## 3. RESULTADO(S)

Determinação	Resultado		
	/100mL	/200mL	%VD
Umidade e voláteis (g)	92,92 (0,01) <sup>a</sup>	185,84	-
Cinzas (g)	0,22 (0,01) <sup>a</sup>	0,44	-
Lipídios totais (g)	ND <0,10 <sup>b</sup>	ND <0,10 <sup>b</sup>	0
Proteína (Nx5,75) (g)	ND <0,10 <sup>b</sup>	ND <0,10 <sup>b</sup>	0
Fibra alimentar total (g)	ND <0,10 <sup>b</sup>	ND <0,10 <sup>b</sup>	0
Carboidratos (g)	10,86 <sup>c</sup>	21,72	7
Calorias (kcal)	43 <sup>d</sup>	86	4
Sódio (mg)	1,559 (0,001) <sup>a</sup>	3,118	0
Potássio (mg)	82,56 (0,11) <sup>a</sup>	165,12	-
Ácido ascórbico (mg)	ND < 0,50 <sup>b</sup>	-	-
Antocianinas totais (mg)	24,09 (0,34) <sup>a</sup>	48,19	-

Densidade = 1,04g/mL

<sup>a</sup> Média e estimativa de desvio padrão.

<sup>b</sup> ND = Não Detectado

<sup>c</sup> Calculado por diferença: 104 - (g/100mL umidade + g/100mL cinzas + g/100mL lipídios totais + g/100mL proteína + g/100mL de fibra alimentar total)

<sup>d</sup> O valor calórico da amostra foi calculado pela soma das porcentagens de proteína e carboidratos multiplicados pelo fator 4 (Kcal/g) somado ao teor de lipídios totais multiplicado pelo fator 9 (Kcal/g).

## 4. COMENTÁRIO (S)

O método utilizado na determinação de Fibra Alimentar Total, Solúvel e Insolúvel quantifica parcialmente polissacarídeos tais como maltodextrina, amido resistente, amido modificado, polidextrose, inulina e frutooligossacarídeos.

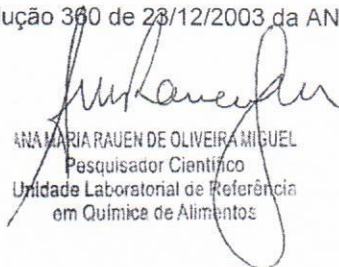
## OBSERVAÇÕES

- a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle.

- b) Este relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial.
- c) %VD: Valores diários de referência foram calculados de acordo com a resolução 360 de 23/12/2003 da ANVISA.

Visto

  
REGINA PRADO ZANÉS FURLANI  
Diretor Técnico de Serviço  
Unidade Laboratorial de Referência  
em Química de Alimentos

  
ANA MARIA RAUEN DE OLIVEIRA MIGUEL  
Pesquisador Científico  
Unidade Laboratorial de Referência  
em Química de Alimentos