
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE -
INTERUNIDADES

TESE DE DOUTORADO

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE β -ALANINA ASSOCIADA AO
TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE NO
DESEMPENHO DE *SPRINTS* REPETIDOS.

FABIO MILIONI

Setembro - 2018

Bauru/SP




FABIO MILIONI

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE β -ALANINA ASSOCIADA AO
TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE NO
DESEMPENHO DE *SPRINTS* REPETIDOS.**

FABIO MILIONI

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Moura Zagatto

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Papoti



Tese apresentada à Faculdade de Ciências do Campus de Bauru da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade.

Outubro - 2018

Bauru/SP

Milioni, Fabio.

Influência da suplementação de β -alanina associada ao treinamento intervalado de alta intensidade no desempenho de sprints repetidos / Fabio Milioni, 2018

125 f. : il.

Orientador: Alessandro Moura Zagatto

Coorientador: Marcelo Papoti

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2018

1. β -Alanina. 2. Carnosina. 3. Equilíbrio ácido-base. 4. Fadiga muscular. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE FABIO MILIONI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 20 dias do mês de agosto do ano de 2018, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ALESSANDRO MOURA ZAGATTO - Orientador(a) do(a) Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências de Bauru - SP, Prof. Dr. BRUNO GUALANO do(a) . / Universidade de São Paulo - Escola de Educação Física e Esportes - São Paulo /SP, Prof. Dr. BRYAN SAUNDERS do(a) Escola de Educação Física e Esportes / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. FÚLVIA DE BARROS MANCHADO GOBATTO do(a) Faculdade de Ciências Aplicadas / UNICAMP-Limeira, Prof. Dr. EDUARDO ZAPATERRA CAMPOS do(a) Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Educação Física / Universidade Federal de Pernambuco, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de FABIO MILIONI, intitulada **Influência da suplementação de -alanina associado ao treinamento intervalado de alta intensidade no desempenho de sprints repetidos..** Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. ALESSANDRO MOURA ZAGATTO

Prof. Dr. BRUNO GUALANO


Prof. Dr. BRYAN SAUNDERS


Profa. Dra. FÚLVIA DE BARROS MANCHADO GOBATTO


Prof. Dr. EDUARDO ZAPATERRA CAMPOS

O presente projeto de pesquisa teve apoio:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)



Processo n° 2016/02683-6 (Bolsa Doutorado no País)

Processo n° 2016/26281-4 (Bolsa BEPE Doutorado no Exterior)

Processo n° 2016/11076-6 (Projeto Regular)

Dedico a presente tese à minha família.
A admiração que tenho por cada um, contribui
para eu me tornar uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao final de grandes ciclos de nossas vidas é necessário a reflexão em relação às pessoas que contribuíram para seu sucesso, nas mais diversas esferas que compõe esse estado de espírito.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e em especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Bolsa Doutorado País Processo n° 2016/02683-6; Bolsa BEPE Doutorado Exterior Processo n° 2016/26281-4; Projeto Regular Processo n° 2016/11076-6) pelo suporte financeiro que me proporcionou vencer barreiras e atingir níveis não imaginados no início dessa jornada;

Aos professores que me rodearam e inspiraram ao longo do caminho. Aos membros da banca, pelas brilhantes contribuições ao trabalho, Dr. Bruno Gualano, Dr. Bryan Saunders, Dra. Fúlvia Manchado-Gobatto e Dr. Eduardo Campos. Aos meus eternos orientadores, Dr. Marcelo Papoti e Dr. Paulo Santiago, e aos que admiro Dr. Cláudio Gobatto, Dr. Fábio Lira, Dr. Anderson Zago, Dr. Nikolai Nordsborg, Dr. Guillaume Millet e Dr. Johnny Padulo;

Ao meu orientador-amigo-mentor Dr. Alessandro Zagatto, pela oportunidade e confiança depositada. Quando a liderança se dá pelo exemplo, os resultados acontecem. Obrigado!;

Aos meus amigos Dr. Ricardo Barbieri e Dr. Fábio Barbieri, cuja amizade transcende as conversas acadêmicas e adentram a porta de casa;

Agradeço também aos amigos de LAFIDE, Gabriel Brisola, Rodrigo de Poli, Gabriel Claus, Yago Medeiros, Elvis Malta, Paulo Redkva, William Miyagi, Vithor Lopes e Gabriel Slomp, aos que fiz na University of Calgary e aos que trago desde o mestrado em Ribeirão Preto;

Um agradecimento especial aos que proveram suporte técnico, Dr. Paulo Muller, Dr. Adelino Sanchez, Me. Alisson da Rocha, Dra. Marisa Medeiros e Dr. Paolo Di Mascio, Ma. Mariane Schulz e Dra. Fernanda Prado;

Aos meus grandes amigos de Salto (ACFA), aos que trago desde a graduação (XXXAMC) e aos meus familiares, avós, tios, tias e primos;

Aos meus pais João e Mari, meu irmão Felipe, minha cunhada Yasmin e meu sobrinho Gabriel, por todo suporte, carinho e apoio que encontro na nossa família. Minha admiração por vocês é imensurável;

E em especial, à minha noiva Taciana, nós sabemos tudo que passamos juntos, a distância que vencemos e aonde queremos chegar. Obrigado por ser meu porto seguro e o motivo para enfrentar com entusiasmo todo dia uma nova batalha. Te amo!

RESUMO

O objetivo da presente tese foi verificar a influência da suplementação de β -Alanina associado ao treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) na *performance* de *sprints* repetidos. Participaram do estudo conduzido em caráter randomizado e duplo-cego, 20 jovens saudáveis alocados em dois grupos (G β [n = 10] – 6,4 g.dia⁻¹ de β -Alanina; GP [n = 10] – 6,4 g.dia⁻¹ de dextrose - placebo). Os participantes foram avaliados em três momentos distintos, previamente ao início, após quatro semanas de HIIT sem suplementação associada (FASE 1) e após 6 semanas de HIIT associada à suplementação (FASE 2). As avaliações foram compostas por teste incremental até exaustão (T_{INC}); séries de 12 *sprints* repetidos (RSA); e teste de tempo limite até exaustão a 115% da velocidade máxima atingida no T_{INC} (T_{LIM}). Previamente (em repouso) e imediatamente após (em estado fadigado) T_{INC} e RSA foram realizadas avaliações neuromusculares compostas por saltos verticais máximos, contrações isométricas máximas de extensão de joelho e estimulação elétrica periférica. O HIIT foi composto de dez corridas de 1 min a 90% da velocidade máxima atingida no T_{INC}, com 1 min de recuperação passiva entre as corridas e frequência de 3 sessões semanais. Previamente ao início da FASE 2 e ao final da intervenção, os participantes foram submetidos a biópsias musculares para determinação do conteúdo de carnosina intramuscular, capacidade de tamponamento muscular *in vitro* (β _{*in vitro*}) e conteúdo de proteínas/enzimas chaves. Após a intervenção, ambos os grupos melhoraram o metabolismo oxidativo (i.e., consumo máximo de oxigênio), entretanto, somente o G β melhorou significativamente o conteúdo de carnosina intramuscular e as variáveis do RSA além de apresentar atenuação da fadiga neuromuscular induzida pelo RSA. Não houve diferenças significativas na capacidade anaeróbia, β _{*in vitro*} e conteúdo de proteínas/enzimas chaves. Dessa forma, a associação entre suplementação de β -Alanina e HIIT proporcionou melhora significativa do desempenho de *sprints* repetidos.

Palavras-chaves: β -Alanina; carnosina; equilíbrio ácido-base; fadiga muscular.

ABSTRACT

The aim of the present thesis was to verify the influence of β -Alanine supplementation associated with high-intensity interval training (HIIT) on the performance of repeated sprints. A randomized, double-blind study enrolled 20 healthy males in two groups (G β [n = 10] - 6.4 g.day⁻¹ of β -Alanine; GP [n = 10] - 6.4 g.day⁻¹ dextrose-placebo). Participants were evaluated at three different times points, prior to beginning, after four weeks of HIIT without associated supplementation (PHASE 1) and after 6 weeks of HIIT with associated supplementation (PHASE 2). The evaluations were composed by incremental test until exhaustion (T_{INC}); set of 12 repeated sprints (RSA); and time-to-exhaustion test at 115% of the maximum T_{INC} velocity (T_{LIM}). Previously (at rest) and immediately after (fatigued state) T_{INC} and RSA, neuromuscular evaluations were performed, consisting of maximum vertical jumps, maximum voluntary isometric contractions of knee extension and peripheral electrical stimulation. The HIIT was composed by ten runs of 1 min at 90% of the maximum velocity reached in the T_{INC}, with 1 min of passive recovery between runs and frequency of 3 sessions per week. Prior to the beginning of PHASE 2 and at the end of the intervention, participants underwent muscle biopsies to determine the content of intramuscular carnosine, in vitro muscle buffering capacity ($\beta m_{in vitro}$) and key protein/enzyme content. After the intervention, both groups improved oxidative metabolism (i.e., maximal oxygen uptake), however, only G β significantly improved the intramuscular carnosine content and the RSA variables in addition to attenuation of the neuromuscular fatigue induced by the RSA. There were no significant differences in anaerobic capacity, $\beta m_{in vitro}$ and content of key protein/enzyme. Thus, the association between β -Alanine supplementation and HIIT provided a significant improvement in the performance of repeated sprints.

Key-words: β -Alanine; carnosine; acid-base balance; muscle fatigue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho experimental do projeto.....	43
Figura 2	Respostas do consumo de oxigênio e concentração de lactato sanguíneo em repouso, esforço supramáximo em 115% V_{max} e mensuração do $EPOC_{rápido}$	47
Figura 3	Esquema representativo dos sinais de força e eletromiográfico durante as avaliações neuromusculares.....	51
Figura 4	Curvas representativas das dosagens de carnosina intramuscular via HPLC...	56
Figura 5	Curva representativa da regressão linear criada entre a quantidade de HCl titulado e o pH medido.....	58
Figura 6	Influência da FASE 1 nas variáveis do T_{INC}	61
Figura 7	Efeito da FASE 1 na <i>performance</i> dos saltos verticais Pré e Pós T_{INC}	62
Figura 8	Efeito da FASE 1 nas variáveis do RSA.....	64
Figura 9	Efeito da FASE 1 na <i>performance</i> dos saltos verticais Pré e Pós RSA.....	65
Figura 10	Efeito da FASE 1 nas variáveis do T_{LIM}	67
Figura 11	Conteúdo intramuscular de carnosina para $G\beta$ e GP em A2 e A3.....	68
Figura 12	Capacidade de tamponamento muscular <i>in vitro</i> para $G\beta$ e GP em A2 e A3...	69
Figura 13	Efeito da FASE 2 nas variáveis do T_{INC}	71
Figura 14	Análise baseada na magnitude do efeito das variáveis provenientes do T_{INC} ..	72
Figura 15	Efeito da FASE 2 na <i>performance</i> dos saltos verticais Pré e Pós T_{INC}	73
Figura 16	Efeitos da FASE 2 nas variáveis neuromusculares provenientes do sinal de força nas condições Pré e Pós T_{INC} em A2 e A3.....	74

Figura 17	Efeitos da FASE 2 nas variáveis neuromusculares provenientes do sinal EMG nas condições Pré e Pós T _{INC} em A2 e A3.....	76
Figura 18	Efeitos da FASE 2 nas variáveis do RSA (Tempo total, Melhor tempo, Pior Tempo e Tempo Médio).....	77
Figura 19	Efeitos da FASE 2 nas variáveis do RSA (Índice de Fadiga e Concentração pico de lactato).....	78
Figura 20	Análise baseada na magnitude do efeito das variáveis provenientes do RSA..	79
Figura 21	Efeito da FASE 2 na <i>performance</i> dos saltos verticais Pré e Pós RSA.....	79
Figura 22	Efeitos da FASE 2 nas variáveis neuromusculares provenientes do sinal de força nas condições Pré e Pós RSA em A2 e A3.....	81
Figura 23	Efeitos da FASE 2 nas variáveis neuromusculares provenientes do sinal EMG nas condições Pré e Pós RSA em A2 e A3.....	82
Figura 24	Efeitos da FASE 2 nas variáveis do T _{LIM}	83
Figura 25	Análise baseada da magnitude do efeito das variáveis provenientes do T _{LIM} ..	84
Figura 26	Conteúdo proteico/enzimático normalizado pela respectiva proteína padrão..	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média ± DP da composição corporal A1 vs. A2.....	60
Tabela 2	Média ± DP da avaliação neuromuscular Pré vs. Pós T _{INC} , A1 vs. A2.....	63
Tabela 3	Média ± DP da avaliação neuromuscular Pré vs. Pós RSA, A1 vs. A2.....	66
Tabela 4	Média ± DP da composição corporal GP vs. G β , A2 vs. A3.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%Gord	Percentual de gordura corporal
$\dot{V}CO_2$	Produção de dióxido de carbono
$\dot{V}O_2$	Consumo de oxigênio
$\dot{V}O_{2base}$	Consumo de oxigênio de linha de base
$\dot{V}O_{2max}$	Consumo máximo de oxigênio
$\dot{V}O_{2pico}$	Consumo de oxigênio pico
[La]_{pico}	Concentração pico de lactato sanguíneo
115%V_{max}	115 % da velocidade atingida em T _{INC}
A1	Avaliações realizadas antes da FASE 1
A2	Avaliações realizadas antes da FASE 2
A3	Avaliações realizadas após a FASE 2
Ag/AgCl	Prata/Cloreto de prata
ATP	Adenosina trifosfato
AV	Ativação voluntária
BF	Músculo bíceps femoral
Ca²⁺	Cálcio inorgânico
CC	Composição corporal
CVM	Contração isométrica voluntária máxima
EMG	Eletromiografia de superfície
FC	Frequência cardíaca
FC_{max}	Frequência cardíaca máxima
F_{pico}	Força pico
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HIF-1α	Fator induzido por hipóxia 1 α
HIIT	<i>High-intensity interval training</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatographic</i>
LAn	Limiar anaeróbio
LDH	Lactato desidrogenase
MCT1	Transportador monocarboxilado 1
MCT4	Transportador monocarboxilado 4
MG	Massa gorda
MM	Massa magra
M-Wave	Máxima capacidade de condução do potencial de ação pelo sarcolema
PC	Peso corporal
PCr	Fosfocreatina
PFK	Fosfofrutoquinase
PGC-1α	Co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PSE	Percepção subjetiva de esforço
RER	Quociente respiratório
RMS	<i>Root mean square</i>
RMS/MW	Razão RMS/M-wave
RMS_BF	<i>Root mean square</i> do músculo bíceps femoral
RMS_VL	<i>Root mean square</i> do músculo vasto lateral
RSA	Teste de capacidade de <i>sprints</i> repetidos
SENIAM	<i>Surface electromyography for the non-invasive assessment of muscles</i>
SIT	<i>Sprint interval training</i>
SV	Salto vertical
T_{HF}	<i>Twitich</i> de alta frequência (sinal de força)

T_{INC}	Teste incremental até exaustão
T_{LF}	<i>Twitch</i> de baixa frequência (sinal de força)
T_{LIM}	Teste de tempo limite até exaustão
TS	<i>Twitch</i> superimposta (sinal de força)
T_s	<i>Twitch single</i> (sinal de força)
VL	Músculo vasto lateral
V_{max}	Velocidade máxima atingida em T _{INC}
$\beta_{in\ vitro}$	Capacidade de tamponamento muscular <i>in vitro</i>
$i\dot{V}O_{2max}$	Intensidade relativa ao consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1.	(Des) Equilíbrio ácido/base durante exercício e o processo de fadiga muscular.....	21
2.2.	Avaliação da fadiga neuromuscular por meio de estimulação elétrica periférica.....	24
2.3.	Suplementação de β-Alanina como estratégia para aumento do conteúdo de carnosina intramuscular.....	27
2.4.	Suplementação de β-Alanina associada ao treinamento intervalado de alta intensidade como estratégia para aumento de desempenho esportivo.....	33
3.	OBJETIVO.....	38
3.1.	Objetivos específicos.....	38
4.	HIPÓTESE DO ESTUDO.....	39
5.	MÉTODOS.....	41
5.1.	Participantes.....	41
5.2.	Desenho experimental.....	41
5.3.	Composição corporal.....	44
5.4.	Teste incremental (T_{INC}).....	44
5.5.	Teste de capacidade de <i>sprints</i> repetidos (RSA).....	45
5.6.	Teste de tempo limite até exaustão (T_{LIM}).....	46
5.7.	Variáveis fisiológicas.....	47
5.8.	Avaliação Neuromuscular.....	48
5.9.	Treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT).....	51

5.10.	Recordatório alimentar.....	52
5.11.	Protocolo de suplementação.....	52
5.12.	Biópsia muscular.....	53
5.13.	<i>High-performance liquid chromatographic</i> (HPLC)	55
5.14.	Mensuração do conteúdo proteico/enzimático via <i>western blots</i>	56
5.15.	Determinação da capacidade de tamponamento <i>in vitro</i> ($\beta_{m_{in vitro}}$).....	57
5.16.	Análise estatística.....	58
6.	RESULTADOS.....	60
6.1.	FASE 1 (n = 19).....	60
6.2.	FASE 2 (GP: n = 9; G β : n = 10).....	68
7.	DISCUSSÃO.....	86
7.1.	FASE 1.....	86
7.2.	FASE 2.....	90
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
9.	CONCLUSÃO.....	101
10.	REFERÊNCIAS.....	102
	ANEXO I – Parecer consubstanciado do CEP.....	119
	ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	122

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A capacidade de executar *sprints* intermitentes com curtos períodos de recuperação (<30 s) é determinante para o sucesso em diversos esportes (MILIONI et al., 2017a). No entanto, a realização de *sprints* repetidos apresenta alto custo energético/metabólico (GAITANOS et al., 1993; MILIONI et al., 2017a) e demanda neuromuscular (HUREAU et al., 2014; MENDEZ-VILLANUEVA et al., 2012), induzindo a instauração do processo de fadiga muscular (BISHOP; EDGE; GOODMAN, 2004; GIRARD et al., 2015; MINETT; DUFFIELD, 2014). A fadiga muscular, por sua vez, é definida por Allen, Lamb e Westerblad (2008) como o declínio progressivo do desempenho de músculos utilizados intensamente, fenômeno largamente recuperado após períodos de repouso.

Energeticamente, esforços intermitentes *all-out* (i.e., máxima intensidade que pode ser realizada sem utilização estratégias) são baseados na alta contribuição energética das vias metabólicas anaeróbias (GAITANOS et al., 1993). Gaitanos et al. (1993), em estudo sobre a interação dos sistemas energéticos durante a realização de *sprints* repetidos, verificaram alta contribuição das vias metabólicas de fosfagênio (~49,6%) e glicolítica (~44,1%) na sustentação da potência média durante o primeiro *sprint* de 6 s de uma série de dez, confirmando a alta participação desses sistemas energéticos durante esforços exaustivos de curta duração.

Entretanto a sustentação energética de *sprints* repetidos a partir da utilização das vias energéticas não mitocondriais (glicolítica e de fosfagênios), gera inevitavelmente a produção exacerbada, e conseqüente acúmulo, de metabólitos responsáveis pelo desequilíbrio ácido-base das células musculares em atividade, em especial íons H⁺ (BISHOP et al., 2004; EDGE et al., 2005). O desequilíbrio ácido-base contribui para a queda progressiva do desempenho, via inibição da atividade da glicolítica, ineficiência da restauração de fosfocreatina (PCr) (BISHOP; EDGE;

GOODMAN, 2004; GAITANOS et al., 1993) e falência dos processos neuromusculares de produção de força (BILLAUT et al., 2013; RACINAIS et al., 2007).

Bishop, Edge e Goodman (2004) verificaram correlações significativas entre a taxa de decaimento do trabalho realizado durante cinco *sprints* de 6 s em cicloergômetro com a capacidade de tamponamento muscular ($r = -0,72$), consumo de oxigênio pico ($\dot{V}O_{2\text{pico}}$) ($r = -0,62$), limiar anaeróbio (LAN) ($r = -0,56$) e concentração de íons H^+ ($r = 0,41$), sugerindo que o acúmulo de íons H^+ atua contrariamente a manutenção da *performance* durante a realização de *sprints* repetidos.

As correlações inversas entre $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ e LAN com a taxa de decaimento do trabalho realizado durante *sprints* verificada por Bishop, Edge e Goodman (2004) tornam claro que uma maneira de diminuir os efeitos prejudiciais do acúmulo de íons H^+ resultantes da prática de *sprints* repetidos seria a otimização do metabolismo oxidativo (mitocondrial). A literatura tem frequentemente demonstrado resultados promissores em relação à adaptações desse sistema energético a partir da administração de treinamento intervalado de alta intensidade (GIBALA, 2009; GIBALA et al., 2012). Pequenas “doses” diárias de exercícios com baixo volume e alta intensidade geram eficientemente adaptações positivas desse metabolismo, o qual aparenta estar intimamente ligado a capacidade de recuperação após esforços intermitentes (TOMLIN; WENGER, 2001) bem como na sustentação da intensidade durante a prática de *sprints* repetidos (MCGAWLEY; BISHOP, 2015; MILIONI et al., 2017b).

Ainda, estratégias nutricionais e suplementos ergogênicos que potencialmente atuem no aumento da capacidade de tamponamento dos íons H^+ acumulados durante esforços exaustivos, possivelmente contribuiriam com o atraso da instauração da fadiga muscular e manutenção da *performance* durante *sprints* repetidos. Nesse sentido, diversos estudos tem voltado a atenção para a carnosina, um dipeptídeo encontrado em altas concentrações no tecido muscular (ARTIOLI et

al., 2010), que em função do seu pKa de ~6,83, atua como um importante tampão intramuscular (BAGUET et al., 2010; SALE et al., 2013), além de outros papéis fisiológicos como a ação antioxidantes e a regulação da sensibilidade ao cálcio (Ca^{2+}) (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013).

Entretanto, o conteúdo intramuscular de carnosina é limitado pela disponibilidade do aminoácido β -Alanina, que juntamente com a L-Histidina (e a ação da enzima carnosina sintase) compõem a carnosina muscular (HARRIS et al., 2006). A β -Alanina *per se* tem ação ergogênica limitada (TREXLER et al., 2015), porém, a suplementação de quatro semanas de β -Alanina em doses diárias de 5,2 – 6,4 g é capaz de aumentar em até 60% o conteúdo de carnosina intramuscular, os quais permanecem elevados por até 3 – 6 semanas após a interrupção da suplementação (BAGUET et al., 2009).

Apesar de pouco investigada até o presente momento, a associação de treinamento intervalado de alta intensidade e suplementação de β -Alanina tem apresentado resultados promissores em relação ao aumento de desempenho, em especial de exercícios contínuos. Smith et al. (2009a) verificaram aumento significativo no $\dot{V}\text{O}_{2\text{pico}}$ e no tempo para exaustão em exercício na intensidade referente ao $\dot{V}\text{O}_{2\text{pico}}$ após seis semanas de suplementação de β -Alanina associada ao treinamento intervalo de alta intensidade, resultado não observado para o grupo placebo do mesmo estudo e Van Thienen et al. (2009) verificaram em ciclistas treinados a melhora em *sprint* de 30 s em cicloergômetro após esforço de longa duração (110 min de esforços intermitentes submáximos + 10 min de esforço máximo) quando compararam o desempenho de grupo placebo com grupo suplementado com β -Alanina durante 8 semanas.

Contudo, a instauração da fadiga muscular durante *sprints* repetidos é aparentemente um processo multifatorial e ocorre não somente em função da diminuição do desempenho no fornecimento de energia (BISHOP; EDGE; GOODMAN, 2004; GAITANOS et al., 1993) e queda

da efetividade do sistema de tamponamento (i.e., manutenção do pH muscular) (BISHOP et al., 2004; EDGE et al., 2005), mas também devido a diminuição da capacidade dos ajustes neurais, centrais e periféricos, durante o exercício (AMANN, 2011; BILLAUT et al., 2013; MENDEZ-VILLANUEVA et al., 2012).

Em relação ao exercício de *endurance* de alta intensidade, evidências sugerem que alterações metabólicas, tais como a queda do pH intramuscular, geram sinalização (i.e., conduzida via grupo III/IV de nervos aferentes) ao sistema nervoso central (SNC), capaz de diminuir a magnitude do *drive* motor. Esse mecanismo de *feedback* é assumido como um possível regulador central da fadiga muscular, responsável por prevenir distúrbios excessivos a homeostase da musculatura e potenciais riscos ao organismo (AMANN et al., 2011, 2013; BILLAUT et al., 2013). Entretanto, quando investigados *sprints* repetidos, a existência desse mecanismo e as possíveis interações das ações de mecanismos centrais e periféricos do processo de fadiga muscular não estão completamente entendidas, e tampouco se o treinamento intervalado de alta intensidade e/ou a suplementação de β -Alanina são fatores que contribuiriam com a manutenção das condições neurais durante esse tipo de exercício.

Atualmente, diversos estudos tem se dedicado a entender de que forma a fadiga muscular induzida pelo exercício relaciona-se com fatores neuromusculares (tanto periféricos, quanto centrais) por meio da utilização de estímulos elétricos supramáximos aplicados ao nervo periférico (GIRARD; BISHOP; RACINAIS, 2013; MENDEZ-VILLANUEVA et al., 2012; RACINAIS et al., 2007). Racinais et al. (2007) encontraram diminuição tanto da ativação voluntária (fadiga central), quanto na amplitude do sinal eletromiográfico após uma série de dez *sprints* de 6 s em cicloergômetro com 30 s de intervalo. Contrariamente, Girard, Bishop e Racinais (2013) não encontraram alterações significativas dos padrões citados anteriormente após dez *sprints* de 6 s em cicloergômetro com 30 s de intervalo, seguidos de 6 min de intervalo e mais

cinco *sprints* de 6 s com 30 s de intervalo. Entretanto, os autores verificaram queda significativa das respostas do quadríceps às estimulações do nervo femoral em repouso (-40%) indicando forte influência da fadiga periférica após a série de *sprints* (GIRARD; BISHOP; RACINAIS, 2013).

Mendez-Villanueva et al. (2012) encontraram correlações significativas entre a ressíntese de PCr e a *performance* de *sprints* repetidos ($r = 0,67$). Porém, o mesmo estudo mostrou que após 6 min de recuperação de uma série de dez *sprints* em cicloergômetro, os estoques de PCr já se encontram quase completamente restaurados. Por outro lado, a amplitude do sinal eletromiográfico e o pH intramuscular ainda permanecem prejudicados, resultando na queda do desempenho dos *sprints* e evidenciando o estado de fadiga neuromuscular, contudo, sem ser possível detectar com exatidão a contribuição dos componentes centrais e periféricos.

Nesse sentido, o aumento da capacidade de tamponamento intramuscular (via suplementação de β -Alanina e aumento do conteúdo de carnosina intramuscular) juntamente com otimização do sistema oxidativo (induzido pelo treinamento intervalado e alta intensidade), caracterizam-se como uma estratégia promissora para contra-atacar os efeitos da acidose induzida por esforços intermitentes *all-out* (tais como *sprints* repetidos), uma vez que facilitaria a manutenção da homeostase da célula muscular, contribuindo com os processos fisiológicos de fornecimento de energia e minimizando a fadiga no sistema neuromuscular, retardando a queda de desempenho e conseqüentemente aumentando a *performance* durante a repetição de *sprints*.

Dessa forma, a presente tese teve como objetivo geral, investigar a influência da associação do treinamento intervalado de alta intensidade e da suplementação de β -Alanina no desempenho de *sprints* repetidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. (Des) Equilíbrio ácido/base durante exercício e o processo de fadiga muscular

Quando contrações musculares ocorrem de maneira contínua e/ou intensa, há notória e progressiva queda dos níveis de desempenho, que pode ser revertida após períodos de recuperação (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008). Esse processo é classicamente denominado de fadiga muscular e pode ser definido como fenômeno multifatorial que ocasiona a redução dos níveis de força/potência produzidos pela contração muscular (ENOKA; DUCHATEAU, 2008; GANDEVIA, 2001).

Dentre os fatores que induzem à fadiga muscular, a literatura estabelece alguns deles como determinantes para a instauração do supracitado processo, tais como redução dos níveis de ATP (WESTERBLAD; ALLEN; LÄNNERGREN, 2002), diminuição da liberação/reabsorção de cálcio inorgânico (Ca^{2+}) pelo retículo sarcoplasmático (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008), redução do glicogênio muscular (HERMANSEN; HULTMAN; SALTIN, 1967), acúmulo de fosfato inorgânico (DEBOLD, 2012; WESTERBLAD; ALLEN; LÄNNERGREN, 2002), falência da bomba de sódio/potássio (NORDSBORG et al., 2003) e especialmente o acúmulo de íons H^+ e consequente indução da acidose (diminuição do pH intracelular) (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; DEBOLD, 2012; FABIATO; FABIATO, 1978).

A alta demanda energética durante o exercício ocasiona o aumento da taxa de ressíntese de ATP por fontes não-mitocondriais (sistema glicolítico e de fosfagênio), causando desequilíbrio entre produção e supressão dos íons H^+ gerados nesse processo e consequente acidose intramuscular (MCGINLEY; BISHOP, 2016a). Há evidências de que a acidose intramuscular seja capaz de perturbar o processo de ressíntese de fosfocreatina (HARRIS et al., 1976), prejudicar o processo de glicólise pela inibição de importantes enzimas alostéricas como a fosfofrutoquinase (PFK) (TRIVEDI; DANFORTH, 1966) e por fim, inibir o funcionamento do

maquinário contrátil do músculo (FABIATO; FABIATO, 1978), inclusive ao nível das pontes cruzadas de miofilamentos (DEBOLD, 2012).

Recentemente tem sido discutido a real contribuição da diminuição do pH intramuscular (induzido via intensa utilização de vias energéticas não mitocondriais e aumento da produção de íons H^+) na instauração do processo de fadiga, visto que alguns estudos falharam em verificar queda significativa dos níveis de força gerados com concomitante queda do pH intramuscular, ou até mesmo verificaram aumento do nível de força isométrica enquanto o pH permanecia depreciado (WESTERBLAD, 2016). O mesmo autor argumenta que estudos *in vivo* não conseguiram reproduzir a regulação negativa gerada pela queda do pH nas enzimas reguladoras da glicogenólise e glicólise anaeróbia (em especial a PFK) verificadas em estudo *in vitro* (WESTERBLAD, 2016).

De qualquer maneira, Fitts (2016) refuta os pressupostos trazidos anteriormente, mas contemporiza que de fato a acidose intramuscular não é um fator isolado da causa da fadiga e que por isso nem sempre as alterações do pH são acompanhadas por alterações nos níveis de força, mas que todavia, a alteração do pH intramuscular altera sobremaneira o funcionamento de outros mecanismos, como as bombas de sódio/potássio, a liberação/reabsorção de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e até mesmo a ressíntese de ATP, caracterizando a acidose muscular, senão como o principal fator indutor da fadiga, um fator para ser amplamente considerado.

Tem sido sugerido, que mesmo ligeira diminuição do pH intramuscular pode ocasionar prejuízos aos níveis de força produzidos por fibras musculares isoladas (FABIATO; FABIATO, 1978; PATE et al., 1995; RICCIARDI et al., 1994). Estudos demonstraram em fibras musculares isoladas (cardíacas e esqueléticas), diminuição de 18% – 40% na tensão isométrica (força) produzida após redução no pH intramuscular (FABIATO; FABIATO, 1978; METZGER; MOSS, 1987; PATE et al., 1995).

Spriet et al. (1989) verificaram concomitante aumento na concentração intramuscular de íons H^+ e redução da *performance* de potência (~40% na potência máxima) após esforços intermitentes em intensidade de *all-out* (3 *sprints* de 30 s em cicloergômetro isocinético). Similarmente, Hargreaves et al. (1998) encontraram significativa redução na potência pico em cicloergômetro juntamente com aumento no acúmulo de íons H^+ após séries de esforços de 30 s máximos em cicloergômetro.

Nesse sentido, dois importantes estudos merecem destaque. No primeiro, Bishop et al. (2004) induziram alcalose metabólica via ingestão oral de bicarbonato de sódio em 10 mulheres saudáveis não treinadas e verificaram, durante série de 5 *sprints* de 6 s com 30 s de recuperação passiva, aumento do trabalho total da série e da *performance* dos *sprints* 4, 5 e 6. O mesmo grupo recrutou 34 mulheres saudáveis não treinadas que realizaram a mesma série de *sprints* repetidos e verificaram correlações significativas entre o índice de fadiga (decaimento percentual da *performance* da série de *sprints*) e a capacidade de tamponamento muscular (*in vivo*) ($r = -0,72$), $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ ($r = -0,62$), e alterações na concentração intramuscular de íons H^+ ($r = 0,41$) (BISHOP; EDGE; GOODMAN, 2004).

No primeiro estudo citado (BISHOP et al., 2004) é possível verificar indícios de que o controle da acidose (via indução de alcalose por ingestão de bicarbonato de sódio) pode resultar em aumento do desempenho em tarefas que demandem alta utilização de vias não-mitocondriais; e no segundo estudo foi verificado de maneira direta a associação entre a capacidade de tamponamento intramuscular (supressão da acidose) e da concentração de íons H^+ (gerados pelo exercício) presente nas células musculares com a manutenção da *performance* durante a realização de *sprints* repetidos.

2.2. Avaliação da fadiga neuromuscular por meio de estimulação elétrica periférica

A fadiga muscular induzida pelo exercício é definida como a redução da capacidade de produção/manutenção de força/potência ocorre não somente devido a fatores periféricos, mas também em função da incapacidade do sistema nervoso central em manter o *drive* motor (GANDEVIA, 2001).

Diversos procedimentos são capazes de detectar o momento da falha ou a incapacidade de manutenção da intensidade da tarefa proposta, tais como contrações voluntárias máximas (MILIONI et al., 2016a), série de saltos (MILIONI et al., 2017c) e até mesmo a potência gerada em cicloergômetro (SPRIET et al., 1989). Durante o exercício, a possibilidade de sustentação da força inicial aplicada é multifatorial e depende da capacidade de manutenção da homeostase do músculo ativo e essencialmente da eficiência dos motoneurônios em entregar os estímulos neurais na fenda neuromuscular (i.e. fadiga periférica), soma-se também a incapacidade do *drive* motor em manter voluntariamente o nível ótimo das taxas de disparos dos estímulos neurais (i.e. fadiga central) tanto em nível cortical (córtex motor – fadiga supraespinhal) quanto em nível espinhal, gerando a falha durante a tarefa (GANDEVIA, 2001).

Existem evidências de que condições voluntárias de emprego da força máxima são na verdade condições submáximas de esforço, ou seja, não atingem a real capacidade de produção de força, isso devido a uma “reserva” teórica existente e acessada somente em circunstâncias especiais (GANDEVIA, 2001). Uma das maneiras mais recorrentes de investigação da capacidade de ativação voluntária é a utilização da técnica denominada *Twitch Interpolation*, que consiste em estimular eletricamente em níveis supramáximos o nervo motor de determinado grupamento muscular, monitorando a amplitude da força evocada pelo estímulo elétrico no músculo relaxado e superimpondo uma contração isométrica voluntária máxima (CVM) (MERTON, 1954).

Além do monitoramento da força gerada pelo estímulo elétrico, outra possibilidade de análise se dá por meio da eletromiografia de superfície (EMG). Em condições de estimulação

submáxima, o estímulo elétrico viaja pelas fibras aferentes Ia, em função de seu maior diâmetro se comparado ao *pool* de motoneurônios- α , diretamente para a espinha, gerando nesse nível uma resposta pós-sináptica e provocando o desencadeamento de potenciais de ação que percorrem os motoneurônios- α em uma resposta eferente direto no músculo denominada Reflexo-H (AAGAARD et al., 2002). Essa técnica é comumente usada para o monitoramento da capacidade de transmissão do impulso neural pelo *pool* de motoneurônios- α (PERREY et al., 2010; RACINAIS et al., 2007).

À medida que a intensidade dos estímulos aumenta, até mesmo os axônios mais finos do *pool* de motoneurônios- α são excitados, gerando tanto uma resposta eferente no músculo, quanto a propagação antidrômica desse estímulo, o qual também viaja pelos axônios dos motoneurônios- α no sentido da espinha, e chocam-se com a resposta pós-sináptica gerada na mesma, anulando gradualmente o Reflexo-H. Quando esse fenômeno ocorre em intensidades supramáximas de estimulação elétrica, trata-se da máxima manifestação da *M-Wave* e significa a máxima capacidade de excitação/condução do potencial de ação pelo sarcolema do músculo monitorado pela eletromiografia (AAGAARD et al., 2002).

Dessa forma, basicamente a técnica de estimulação elétrica neuromuscular consiste em aplicar estímulos elétricos sob o ponto de maior sensibilidade do nervo motor do grupamento muscular a ser investigado, até a determinação de uma intensidade em que o estímulo elétrico não seja capaz de gerar aumento da força evocada no músculo relaxado e torne-se possível a identificação do platô da *M-Wave* (MILIONI et al., 2016a). A partir da superimposição dos limiares de estimulação (entre 110% e 150%), o percentual de ativação voluntária (AV) pode ser calculado a partir da interpolação dos valores de amplitude do sinal de força resultantes da aplicação de estímulos elétricos superimpostos no músculo relaxado e durante a CVM (GIRARD; BISHOP; RACINAIS, 2013; MILIONI et al., 2016a; MILLET et al., 2011; PERREY et al., 2010).

Quando avaliado pré e pós uma condição fatigante, as alterações provenientes dessas medidas geram uma resposta quanto ao percentual de ativação central (GIRARD; BISHOP; RACINAIS, 2013). O aumento da amplitude do sinal de força adicional gerado pela estimulação elétrica durante a CVM com concomitante queda nos nível de força isométrica é associado com padrões de fadiga central (KOOISTRA; DE RUITER; DE HAAN, 2007); enquanto que a diminuição da amplitude do sinal de força adicional gerado pela estimulação elétrica no musculo relaxado é uma evidência de fadiga periférica (GANDEVIA, 2001; MERTON, 1954; MILLET et al., 2011; PLACE et al., 2010). Além disso, a razão entre a *root mean square* (RMS) do sinal eletromiográfico e a máxima amplitude da *M-Wave* (RMS/MW), é utilizada para investigação da fadiga central, uma vez que a manutenção da *M-Wave* (e conseqüente preservação da capacidade de condução do sarcolema) ocorrendo concomitantemente com a diminuição da RMS sinaliza uma possível falha do *drive* motor central em gerar impulsos neurais (GIRARD; BISHOP; RACINAIS, 2013; MILLET et al., 2011; PERREY et al., 2010; RACINAIS et al., 2007).

Apesar das possibilidades de análises e ferramentas fornecidas a partir da utilização da técnica da estimulação elétrica neuromuscular, ainda não há um consenso na literatura sobre em que nível do *drive* motor descendente (desde o córtex motor até a contração muscular propriamente) exercícios fatigantes podem perturbar a manutenção da tarefa (i.e. *sprints* repetidos). Racinais et al. (2007) encontraram diminuição tanto do percentual de ativação voluntária, quanto na razão RMS/MW após uma série de dez *sprints* em cicloergômetro de 6 s com 30 s de intervalo.

Contrariamente, Girard et al. (2013) não encontraram alterações significativas na AV e RMS/MW após dez *sprints* em cicloergômetro de 6 s com 30 s de intervalo, seguidos de 6 min de intervalo e mais cinco *sprints* de 6 s com 30 s de intervalo. Entretanto, os autores verificaram queda significativa da amplitude gerada no sinal de força pelo estímulo elétrico aplicado no

músculo relaxado (> 40%) indicando que a queda de *performance* durante os *sprints* sofreu forte influência da fadiga periférica.

Em função do desacordo da literatura e até mesmo ao baixo número de estudos que verificaram a composição do processo de fadiga neuromuscular (central, periférica ou ambos) durante esforços intermitentes de alta intensidade, mais estudos que se utilizem de técnicas padronizadas se fazem necessário visando o entendimento dos fatores neuromusculares e fisiológicos que envolvem esse tipo de tarefa.

2.3. Suplementação de β -Alanina como estratégia para aumento do conteúdo de carnosina intramuscular

Em meados de 1900, o bioquímico russo Vladimir Gulevich descobriu um novo dipeptídeo encontrado especialmente no tecido muscular esquelético de mamíferos e denominou de carnosina (“*carnis*” do latim, carne) (BOLDYREV, 2012). A carnosina (β -alanyl-L-histidina) é sintetizada no tecido muscular a partir do aminoácido L-Histidina e do aminoácido não-proteogênico β -Alanina (HARRIS et al., 2006); reação catalizada pela ação da enzima carnosina sintase (KALYANKAR; MEISTER, 1959).

Encontrada especialmente em mamíferos que necessitam de deslocamentos potentes ou tolerar longos períodos em ausência de oxigênio, tais como baleias, que chegam a permanecer cerca de 30 min nadando em águas profundas e precisam lidar de forma eficiente com a queda do pH causada pelo longo período em hipóxia (ABE, 2000; ARTIOLI et al., 2010). A principal ação da carnosina é de tamponante intramuscular, suprimindo a ação acidificante dos íons H^+ (ARTIOLI et al., 2010)

Sua eficiência como tamponante se deve ao seu valor de pKa (~6,83) (SMITH, 1938) ser muito próximo ao valor de pH das células musculares (~6,5 - 7,2) (COSTILL et al., 1984),

permitindo ação eficiente na supressão dos íons H^+ . Além de ser o principal tamponante intramuscular (SALE; SAUNDERS; HARRIS, 2010), a carnosina possui outras funções fisiológicas, tais como antioxidante (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013), antiglicação de proteínas (HIPKISS; MICHAELIS; SYRRIS, 1995), neuroprotetiva (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013), cardioprotetiva (MCCARTY; DINICOLANTONIO, 2014) e evidências apontam a carnosina desempenhando importante papel no aumento da sensibilidade ao Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático durante a contração muscular (DUTKA et al., 2012; DUTKA; LAMB, 2004).

A carnosina é encontrada em concentrações muito baixas na corrente sanguínea (PARK; VOLPE; DECKER, 2005) devido à rápida ação da enzima carnosinase, responsável pela degradação de carnosina (ASATOOR et al., 1970). Ainda, devido a ausência de transportador específico, as células musculares são incapazes de captar a carnosina circulante (BAUER; SCHULZ, 1994), ficando a concentração intracelular de carnosina limitada a disponibilidade do aminoácido β -Alanina (HARRIS et al., 2006), uma vez que L-Histidina é encontrada em abundância no tecido muscular esquelético. Por outro lado, a β -Alanina é produzida endogenamente pelo fígado (FRITZSON, 1956; MATTHEWS; TRAUTS, 1987) ou, em maior escala, obtida por meio do consumo de carnes vermelhas, aves e peixes (ABE, 2000).

Diferença importante do conteúdo intramuscular de carnosina pode ser notada entre homens ($21,3 \pm 4,2 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de músculo seco) e mulheres ($17,5 \pm 4,8 \text{ mmol.g}^{-1}$ de músculo seco) (BAGUET et al., 2012; MANNION et al., 1992), mas em média, indivíduos saudáveis, apresentam conteúdo intramuscular de carnosina de aproximadamente 20 mmol.kg^{-1} de músculo seco (KENDRICK et al., 2009). Além disso, há uma expressiva diminuição de carnosina intramuscular ao longo da vida, não sendo claro o motivo pelo qual esse fenômeno ocorre, mas

aparentemente parece estar ligado a progressiva diminuição da secreção de testosterona (BAGUET et al., 2012).

Fibras musculares do tipo II apresentam conteúdo de carnosina 120% maior que fibras do tipo I (23,2 mmol.kg⁻¹ de músculo seco e 10,5 mmol.kg⁻¹ de músculo seco, respectivamente) (HARRIS; DUNNETT; GREENHHAFF, 1998). Esse dado entra em acordo com a principal ação fisiológica da carnosina, uma vez que reconhecidamente fibras do tipo II apresentam um aporte energético proveniente do metabolismo glicolítico (não oxidativo) significativamente maior que fibras do tipo I, e dessa forma, necessitam da ação tamponante da carnosina (DERAVE et al., 2010).

Ainda, evidências discretas apontam que o exercício físico contribui para o aumento do conteúdo de carnosina intramuscular, apesar da maioria dos estudos terem falhado na tentativa de comprovar essa hipótese (DERAVE et al., 2010). Parkhouse et al. (1985) compararam o conteúdo de carnosina intramuscular de corredores velocistas e remadores com maratonistas e indivíduos não treinados e verificaram valores significativamente maiores para primeiro grupo. Por outro lado, diversos modelos de treinos (treinamento resistido, treinamento de *sprints* e treinamento isocinético) aplicados entre 4 a 16 semanas, não resultaram em aumento significativos do conteúdo intramuscular de carnosina em indivíduos não especificamente treinados (BAGUET et al., 2011; KENDRICK et al., 2008, 2009; MANNION; JAKEMAN; WILLAN, 1994). Dessa forma, é possível especular se o alto conteúdo de carnosina verificado em velocistas de elite são portanto, um importante critério de seleção de talentos geneticamente determinados ou o resultado da adaptação lenta devido anos de treinamento.

De qualquer forma, atualmente, a principal estratégia para o aumento do conteúdo intramuscular de carnosina é a suplementação crônica de β -Alanina (BLANCQUAERT; EVERAERT; DERAIVE, 2015). Estudos cada vez mais rigorosos apontam para efetividade dessa

intervenção, sendo que aparentemente a suplementação entre 4,0 a 6,4 g.dia⁻¹ é suficiente para aumentar em até 80% o conteúdo intramuscular de carnosina após 10 semanas (HILL et al., 2007). Ainda, fibras do tipo I e II respondem de maneira semelhante aos protocolos de suplementação de β -Alanina (HILL et al., 2007).

De maneira geral, o aumento do conteúdo intramuscular de carnosina parece estar atrelado à quantidade total de β -Alanina ingerida, uma vez que a relação dose-resposta entre essas duas variáveis (conteúdo intramuscular de carnosina e quantidade de β -Alanina ingerida) apresentam forte dependência linear ($R^2 = 0,92$) (STELLINGWERFF et al., 2012).

É importante ressaltar que tem sido verificada alta variação individual do aumento do conteúdo intramuscular de carnosina após protocolo de suplementação de β -Alanina (aumentos individuais de 15% a 55%) (BAGUET et al., 2009) sendo que as principais suspeitas giram em torno do conteúdo intramuscular prévio de carnosina (linha de base antes do início do protocolo de suplementação de β -Alanina) (HARRIS et al., 2006), a co-ingestão de β -Alanina com refeições específicas (STEGEN et al., 2013), associação da suplementação β -Alanina com treinamento físico (BEX et al., 2015), transaminação da β -Alanina ingerida (via GABA-T e AGXT2) e até mesmo a disponibilidade limitada de carnosina sintase (BLANCQUAERT et al., 2016; HOSTRUP; BANGSBO, 2016).

Logo, a questão não é se a suplementação de β -Alanina aumenta o conteúdo intramuscular de carnosina, mas como otimizar essa estratégia (HOSTRUP; BANGSBO, 2016). Ações que evitassem a transaminação da β -Alanina ingerida poderiam representar grande influência no aumento do conteúdo intramuscular de carnosina, entretanto, fármacos que inibem a transaminação (i.e., vigabatrin e ácido aminooxiacético) causam severos efeitos colaterais. Outra possibilidade seria a saturação das enzimas transaminadoras a partir de uma grande dose única de β -Alanina, seguido da ingestão de pequenas doses diversas vezes ao dia e de preferência em

cápsulas ou tabletes de liberação lenta (HOSTRUP; BANGSBO, 2016). Além de contribuírem para redução da excreção de β -Alanina através da urina, a liberação lenta da β -Alanina diminui a manifestação de parestesia, único efeito colateral reportado da ingestão de β -Alanina (breve alteração da sensação na pele) (DÉCOMBAZ et al., 2012).

Portanto, a suplementação de β -Alanina parece garantir de maneira importante o aumento do conteúdo de carnosina intramuscular (SAUNDERS et al., 2017a) e por consequência a capacidade de tamponamento intramuscular (HILL et al., 2007). Harris et al. (2006) verificaram aumento médio de 5,5% da capacidade de tamponamento intramuscular, sendo ~4,0 % em fibras do tipo I e ~7,0% em fibras do tipo II. Ainda, a contribuição da carnosina para o processo de tamponamento aumentou de ~6,5% para ~10,0% em fibras do tipo I e de ~12,0 % para ~18,0% em fibras do tipo II (HARRIS et al., 2006). No entanto, dois fatores limitantes a serem considerados nessa interpretação são a dificuldade em isolar a melhora na capacidade de tamponamento induzida pela ingestão de β -Alanina das adaptações decorrentes do exercício físico e a própria variabilidade (baixa sensibilidade) da técnica de mensuração da capacidade de tamponamento (a partir da titulação de um ácido forte em uma amostra de músculo seco *in vitro*) (MCGINLEY; BISHOP, 2016a).

Dessa forma, a suplementação de β -Alanina, visando aumentar o conteúdo intramuscular de carnosina, surge como uma potencial estratégia capaz de retardar a fadiga ocasionada pela acidose induzida pelo exercício físico e consequentemente aumentar a *performance* esportiva (BRISOLA et al., 2016; DE SALLES PAINELLI et al., 2013), especialmente em esforços de alta intensidade, com grande participação do metabolismo glicolítico e duração entre 1 e 4 min (HOBSON et al., 2012).

Em meta-análise realizada por Hobson et al. (2012), verificou-se que a partir do acúmulo de 179 g de β -Alanina (respeitando os protocolos de suplementação) há efeito positivo

da suplementação em exercícios contínuos supramáximos com duração entre 60 e 240 s. Em esforços como tempo para exaustão em cicloergômetro, em intensidade supramáximas (110% – 120% da potência máxima ou da intensidade atrelada ao $\dot{V}O_{2\text{pico}}$), a suplementação de β -Alanina tem se mostrado eficiente no aumento da *performance*. Há relatos na literatura reportando aumentos entre 9% e 32% do tempo para exaustão após protocolo de 28 - 42 dias de suplementação de β -Alanina (BELLINGER; MINAHAN, 2016; DANAHER et al., 2014; GLENN et al., 2015; HILL et al., 2007; SALE; SAUNDERS; HARRIS, 2010).

O efeito da suplementação de β -Alanina é menos claro quando os esforços supramáximos são realizados de forma intermitente. De Salles Painelli et al. (2013) e Tobias et al. (2013) verificaram melhoras significativas após suplementação de β -Alanina na realização de 4 *Wingate* (30 s *all-out* em cicloergômetro em carga referente à 7,5% do peso corporal) com 3 min de recuperação. Brisola et al. (2016), ao avaliarem atletas profissionais de polo aquático, verificaram efeito possivelmente benéfico (inferência a partir da magnitude do efeito) de 28 dias de suplementação de β -Alanina no tempo total, tempo médio e pior tempo realizados em série de *sprints* repetidos na natação. De maneira similar, Claus et al. (2017) encontraram efeitos possivelmente benéficos em teste de *sprints* repetidos em jovens jogadores de polo aquático.

Contrariamente, Milioni et al. (2017) não verificaram efeitos significativos de 6 semanas de suplementação de β -Alanina em jogadores Sub 19 de basquetebol em *sprints* repetidos de 30 m (com duas mudanças de direção de 180°), assim como Cochram et al. (2015) não encontraram efeitos positivos da suplementação de β -Alanina na realização de 4 *Wingates* com 4 minutos de recuperação. Similarmente, Smith-Ryan et al. (2012) falharam em encontrar resultados benéficos ao investigar os efeitos da suplementação de β -Alanina em corridas de 90%, 100% e 110% da velocidade máxima individual com períodos proporcionalmente maiores de recuperação entre os esforços (15 minutos).

Em recente meta-análise, Saunders et al. (2017b) elencaram, a partir de rigoroso grau de elegibilidade, 40 estudos que abordaram 1461 participantes e verificaram que a duração do exercício modula de maneira significativa o tamanho do efeito da suplementação crônica de β -Alanina ($p = 0,004$) e que de maneira geral o tamanho do efeito da suplementação de β -Alanina como métodos ergogênico é de 0,18. Dessa maneira, os esforços para entender os efeitos da suplementação crônica de β -Alanina, bem como os mecanismos pelo qual essa estratégia realmente se faz eficaz como agente ergogênico devem ser estendidos, uma vez que até o momento a literatura tem demonstrado resultados promissores.

2.4. Suplementação de β -Alanina associada ao treinamento intervalado de alta intensidade como estratégia para aumento de desempenho esportivo

Como tratado no capítulo anterior, a suplementação de β -Alanina é capaz de aumentar o conteúdo intramuscular de carnosina, dipeptídeo que desempenha potente ação tamponante na célula muscular, suprimindo o efeito do acúmulo de íons H^+ provenientes de diversos processos metabólicos relacionados ao exercício físico (queda do pH intramuscular) e, portanto, contribuindo para a melhora/manutenção do desempenho esportivo (HOBSON et al., 2012; SAUNDERS et al., 2017b).

Outra estratégia promissora visando a melhora do desempenho esportivo é o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT). Caracterizado por estágios intermitentes de exercício vigoroso, intercalados por períodos de repouso ou exercício em baixa intensidade (GIBALA et al., 2012), sugere-se que o HIIT seja uma alternativa tempo-eficiente ao treinamento contínuo tradicional, promovendo adaptações similares ou ainda melhores em vários marcadores cardiorrespiratórios, fisiológicos e relacionados à saúde (GIBALA et al., 2012; LITTLE et al., 2010). O HIIT também é uma estratégia eficaz para atletas bem treinados, uma vez que 2% - 4%

de melhora do desempenho (contra-relógio, tempo até exaustão e potência pico) tem sido relatado para essa população (GIBALA et al., 2012; LAURSEN, 2010).

Em função de diversas evidências em relação a capacidade isolada da suplementação de β -Alanina e do HIIT na promoção de efeitos positivos no desempenho esportivo por diferentes mecanismos fisiológicos, na última década verificou-se um aumento do número de investigações científicas unindo essas duas potentes estratégias.

Smith e colaboradores (2009a) recrutaram adultos jovens que realizaram 6 semanas de HIIT composto por 5 – 6 estágios de 2 min em intensidade variando entre 90% a 115% da potência máxima atingida em teste incremental, com 1 min de repouso passivo e frequência 3 sessões semanais. Juntamente com o HIIT, os participantes suplementaram β -Alanina ou Placebo (dextrose), sendo 6 g.dia⁻¹ durante as 3 primeiras semanas e 3 g.dia⁻¹ durante as semanas subsequentes. Os autores verificaram aumento significativo do trabalho total durante teste supramáximo (110% da potência máxima atingida em teste incremental) em cicloergômetro para ambos os grupos, entretanto, somente o grupo suplementado com β -Alanina apresentou melhora significativa do $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ e tempo limite até exaustão durante teste supramáximo em cicloergômetro.

Por outro lado, Walter et al. (2010) não verificaram diferenças na adaptação positiva do $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ entre grupos suplementados com β -Alanina ou placebo (dextrose) e submetidos a 6 semanas de HIIT (5 × 2 min em intensidade entre 90% - 110% da potência pico atingida em teste incremental, com 1 min de descanso passivo e frequência de 3 sessões por semana). Contudo, o estudo citado apresenta duas limitações que podem ter contribuído para o resultado encontrado, a baixa quantidade de β -Alanina (1,5 g.dia⁻¹) administrada em pó e misturada com água (ao invés de acondicionada em cápsulas gastro-resistentes ou *tablets* de liberação lenta) e a ausência da

mensuração do conteúdo de carnosina intramuscular, impedindo conclusões mais efetivas sobre a investigação conduzida.

O mesmo grupo de pesquisa aplicou desenho experimental semelhante e investigou a capacidade da associação entre suplementação de β -Alanina e HIIT em melhorar o limiar de fadiga eletromiográfico (índice análogo ao limiar anaeróbio) e a eficiência da atividade elétrica (índice baseado na atividade eletromiográfica durante exercício em diferentes intensidades) e verificaram resultados menos promissores, com ganhos semelhantes de ambas as variáveis quando comparados os grupos suplementados com β -Alanina e Placebo (SMITH et al., 2009b).

Em relação a efetividade da associação entre suplementação de β -Alanina e HIIT em aumentar o desempenho em exercícios realizados em intensidades superiores ao consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_{2max}$), apesar de poucos trabalhos, há maior concordância nos resultados publicados até o presente momento. Gross et al. (2014) administraram isoladamente por 38 dias $3,2 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}$ de β -Alanina ou Placebo (maltodextrina), seguido de 11 dias de HIIT (9 sessões de $4 \times 4 \text{ min}$ a 90% - 95% da frequência cardíaca máxima com 3 min de recuperação a $> 40\%$ potência pico) e verificaram somente para o grupo suplementado com β -Alanina aumento da contribuição do metabolismo aeróbio e concomitante diminuição do déficit de oxigênio durante 90 s de ciclismo a 110% da intensidade relativa ao $\dot{V}O_{2max}$. Além disso, apesar de não haver diferença na capacidade de tamponamento *in vitro* entre os grupos, o grupo suplementado com β -Alanina aumentou significativamente parâmetros psicológicos (i.e. motivação) durante o período de treinamento.

Resultados ainda mais promissores foram verificados por Bellinger e Minahan (2016) que administraram carga inicial de $6,4 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}$ de β -Alanina (ou placebo – dextrose) durante 28 dias, seguido de 5 semanas de $1,2 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}$ juntamente com treinamento intervalado de *sprints* (SIT – $4 - 6 \times \text{sprints}$ de 1 km com 3 min de recuperação a 50 W). Os autores verificaram aumento

significativo para ambos os grupos do tempo até exaustão em teste supramáximo ($120\% \dot{V}O_{2\max}$) e da intensidade realizada durante as sessões de treino, contudo, com melhora mais pronunciada para o grupo suplementado com β -Alanina. Além disso, somente o grupo suplementado com β -Alanina melhorou os *sprints* 3 e 4 de uma série de 4 *sprints* de 1 km com 3 min de recuperação ativa (50 W).

Finalmente, Cochran et al. (2015) suplementaram $3,2 \text{ g.dia}^{-1}$ de β -Alanina (ou Placebo – dextrose) durante dez semanas, sendo que nas últimas 6 semanas a suplementação foi associada a um programa de SIT (4 – 6 *Wingates* com 4 min de intervalo passivo, 3 vezes por semana), e não verificaram diferença entre os grupos na melhora obtida para marcadores do metabolismo oxidativo, (citocromo C oxidase e atividades enzimática máxima de β -hidroxiacil-CoA desidrogenase), $\dot{V}O_{2\text{pico}}$, capacidade de *sprints* repetido (5%) e desempenho em prova contra-relógio de 250 kJ.

Uma questão interessante foi levantada pelos autores dos trabalhos citados anteriormente; as evidências produzidas até o presente momento apontam que, de fato, a suplementação de β -Alanina apresenta potencial ergogênico, entretanto, aparentemente seu efeito é marginal em relação ao desempenho esportivo uma vez que Saunders et al. (2017b) verificaram um tamanho de efeito de 0,18 (o qual pode ser afetado positiva e negativamente por diversos fatores). Dessa forma a aplicação do HIIT associada à suplementação de β -Alanina pode atuar como um fator de confusão dos resultados obtidos, especialmente em indivíduos não treinados, uma vez que a margem de melhora induzida pelo HIIT é muito grande (especialmente a partir da intervenção com treinamento), diminuindo a sensibilidade de detecção de qualquer efeito benéfico da suplementação de β -Alanina. Essa hipótese se alinha com os resultados dos três últimos artigos abordados, uma vez que Gross et al. (2014) e Bellinger e Minahan (2016) recrutaram ciclistas treinados ($\dot{V}O_{2\max} 60 \pm 5 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $4,5 \pm 0,6 \text{ L.min}^{-1}$, respectivamente) e verificaram

ganhos adicionais ao desempenho em diferentes testes físicos nos grupos suplementados com β -Alanina; e Cochran et al. (2015) recrutaram indivíduos saudáveis mais não especificamente treinados ($\dot{V}O_{2\max}$ 50 ± 6 mL.kg⁻¹.min⁻¹) e não reportaram efeitos adicionais ao grupo suplementado com β -Alanina.

Dessa forma, além da literatura ainda ser limitada em relação aos reais efeitos da associação entre suplementação de β -Alanina e HIIT visando o aumento do desempenho esportivo, novos estudos devem ser conduzidos a partir de desenhos experimentais rigorosos que visem diminuir a influência de fatores de confusão e de fato gerar evidências claras em relação ao real potencial da associação dessas duas estratégias em gerar efeitos benéficos ao desempenho esportivo.

3. OBJETIVO

O objetivo da presente tese foi investigar o efeito da associação da suplementação de β -Alanina com o treinamento intervalado de alta intensidade no desempenho de *sprints* repetidos.

3.1. Objetivos específicos

- Verificar a influência da suplementação de β -Alanina e do treinamento intervalado de alta intensidade na manifestação dos processos de fadiga central e periférica durante *sprints* repetidos;
- Verificar possíveis mudanças de contribuição de cada via energética durante a realização de *sprints* repetidos após período de suplementação de β -Alanina associada ao treinamento intervalado de alta intensidade;
- Verificar a capacidade de tamponamento *in vitro* frente à suplementação de β -Alanina associada ao treinamento intervalado de alta intensidade;
- Verificar o conteúdo de carnosina intramuscular e de proteínas/enzimas alvo como fosfofrutoquinase (PFK), fator induzido por hipóxia 1α (HIF- 1α), lactato desidrogenase (LDH), transportador monocarboxilado 4 (MCT4), Co-ativador 1α do Receptor Ativado por Proliferador do Peroxissoma (PGC- 1α) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH - proteína padrão) antes e após período de suplementação com β -Alanina e treinamento intervalado de alta intensidade.

4. HIPÓTESE DO ESTUDO

Cochran et al. (2015) realizaram estudo longitudinal no qual suplementaram durante dez semanas 3,4 g de β -Alanina (ou placebo) em homens saudáveis mas não especificamente treinados, sendo que nas últimas seis semanas (3 vezes por semana) a suplementação foi associada ao treinamento intervalado de *sprints* composto de 4 – 6 *Wingates* (30 s máximo no cicloergômetro). Para ambos os grupos foram verificadas melhora significativa no $\dot{V}O_{2\text{pico}}$, tempo limite em intensidade constante (250 kJ), capacidade de *sprints* repetidos, marcadores moleculares de conteúdo mitocondrial como citocromo C oxidase e atividade máxima da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase além do aumento significativo do conteúdo de carnosina para o grupo suplementado com β -Alanina, no entanto sem interação significativa entre os grupos.

Os autores assumem a hipótese de que o treinamento de *sprints* repetidos seria uma estratégia tão eficiente para proporcionar adaptações positivas na capacidade oxidativa e na própria *performance* física que dificultaria a detecção de qualquer efeito positivo da suplementação de β -Alanina. Dessa forma, na presente tese se propôs adaptar o estudo realizado por Cochran et al. (2015) e, previamente ao início do período de suplementação, realizar a adaptação física dos participantes recrutados por meio de quatro semanas de treinamento intervalado de alta intensidade. Somente após a supercompensação biológica estimulada pelo período de treinamento prévio foi executada a intervenção proposta (treinamento intervalado de alta intensidade associado à suplementação de β -Alanina), com o intuito de tornar os resultados menos suscetíveis à “ruídos e falsos positivos”.

Nossa hipótese é que o treinamento intervalado de alta intensidade associado à suplementação de β -Alanina acarretariam em aumento da capacidade de tamponamento intramuscular (devido ao aumento do conteúdo de carnosina intramuscular), do conteúdo de proteínas e enzimas relacionadas ao metabolismo glicolítico (PFK, LDH e MCT4). Essas

condições em conjunto agiriam como um fator protetivo da interação do sistema neuromuscular e gerariam a possibilidade de manutenção do *drive* motor e conseqüente atenuação do processo de fadiga neuromuscular, possibilitando à musculatura ativa a capacidade de sustentar a intensidade de exercício por um período proporcionalmente maior e conseqüentemente retardar a queda de desempenho, melhorando o desempenho nos protocolos de testes propostos.

5. MÉTODOS

5.1. Participantes

O tamanho da amostra foi calculado usando o software G*Power (Universität Düsseldorf, Alemanha) e com base no pressuposto de que 4 semanas de 6,4 g.dia⁻¹ de suplementação de β-Alanina induzem ao aumento do conteúdo de carnosina intramuscular (tamanho do efeito de 1,96) (SAUNDERS et al., 2017a). O software foi configurado para fornecer um poder estatístico de 95% e nível alfa de 0,05; o tamanho da amostra calculada foi de n = 9 participantes para cada grupo. Dessa forma, foram convidados a participar do estudo 20 adultos jovens (idade: 25 ± 5 anos; estatura: 173,8 ± 6,8 cm; peso: 74,2 ± 8,0 kg; $\dot{V}O_{2max}$: 44,8 ± 5,5 mL⁻¹.kg⁻¹.min), sem histórico de desordens músculo-esqueléticas, saudáveis, não usuários de tabaco ou álcool, moderadamente ativos (PAUW et al., 2013), porém não engajados em programas regulares de treinamento físico. Eram critérios de exclusão auto reportar-se portador de doenças cardiovasculares e/ou ter feito uso de suplementos nutricionais, especialmente proteicos, como creatina ou *whey protein* nos três meses que antecederam o início do desenho experimental. Não houveram exclusões em função dos critérios reportados anteriormente. O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista e foi realizado respeitando a Declaração de Helsinki. Antes da participação no estudo, todos os participantes foram devidamente informados dos riscos e benefícios dos procedimentos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (protocolo nº 1.461.011).

5.2. Desenho experimental

Participaram voluntariamente do estudo 20 adultos jovens, fisicamente ativos. Inicialmente os participantes compareceram em dois dias não consecutivos ao laboratório para

familiarização aos protocolos de avaliação neuromuscular. As avaliações ocorreram em três momentos distintos, no momento inicial, previamente ao início do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) (A1), após FASE 1 composta por 4 semanas de HIIT (A2) e após FASE 2 composta por 6 semanas de HIIT associado à suplementação (A3). Sequência idêntica de protocolos de testes foram aplicadas nos momentos A1, A2 e A3; respeitando intervalo de 36 - 48 h entre os protocolos de testes. No primeiro dia era realizado avaliação da composição corporal (CC) e da aptidão cardiorrespiratória por meio de absorptiometria de raios-X de dupla energia e teste incremental até exaustão (T_{INC}), respectivamente. No segundo dia, era avaliada a capacidade de realização de *sprints* repetidos (RSA). O protocolo consistia da realização de duas séries de seis *sprints* de 35 m com 10 s de intervalo entre os *sprints* e 4 min de intervalo entre as séries. No terceiro e último dia da semana de avaliação era realizado esforço até a exaustão para mensuração do tempo limite (T_{LIM}) a 115% da intensidade correspondente a velocidade máxima atingida em T_{INC} . Previamente (em repouso) ao T_{INC} e RSA e imediatamente após (em estado fadigado), foram realizadas avaliações neuromusculares compostas por saltos verticais, contrações isométricas voluntárias máximas de extensão do joelho e estimulação elétrica periférica.

Após A2, os participantes responderam a um inquérito alimentar para controle da ingestão proteica e foram alocados em dois grupos experimentais (Grupo β -Alanina [$G\beta$ n = 10]: 6,4 g.dia⁻¹ de β -Alanina; Grupo Placebo [GP n = 10]: 6,4 g.dia⁻¹ de dextrose). A alocação dos participantes obedeceu inicialmente aos resultados obtidos no T_{INC} realizado em A2, sendo que os dez melhores e os dez piores desempenhos em relação ao $\dot{V}O_{2max}$ foram arbitrariamente divididos. Os grupos relacionados ao $\dot{V}O_{2max}$ foram então novamente divididos e randomicamente alocados em $G\beta$ e GP de maneira que cada grupo foi composto por 5 participantes com os melhores desempenhos em relação ao $\dot{V}O_{2max}$ e 5 participantes com os piores desempenhos em relação ao $\dot{V}O_{2max}$.

A FASE 2 do desenho experimental teve intensidades de treino ajustadas e foi associada ao protocolo de suplementação. O HIIT foi composto de dez corridas de 1 min a 90% da velocidade máxima atingida no T_{INC} intercalados por períodos de repouso passivo de 1 min (adaptado de LITTLE et al., 2010). A intensidade de treino foi controlada individualmente a cada corrida por meio da frequência cardíaca (FC) e da percepção subjetiva de esforço (PSE) (FOSTER, 1998). Ao final da FASE 1 e FASE 2, foram coletadas amostras de tecido muscular (músculo vasto lateral) por meio de biópsia com agulha de Bergstron, em repouso, para monitoramento do conteúdo de carnosina intramuscular, capacidade de tamponamento muscular *in vitro* e conteúdo de proteínas/enzimas alvos (Figura 1).

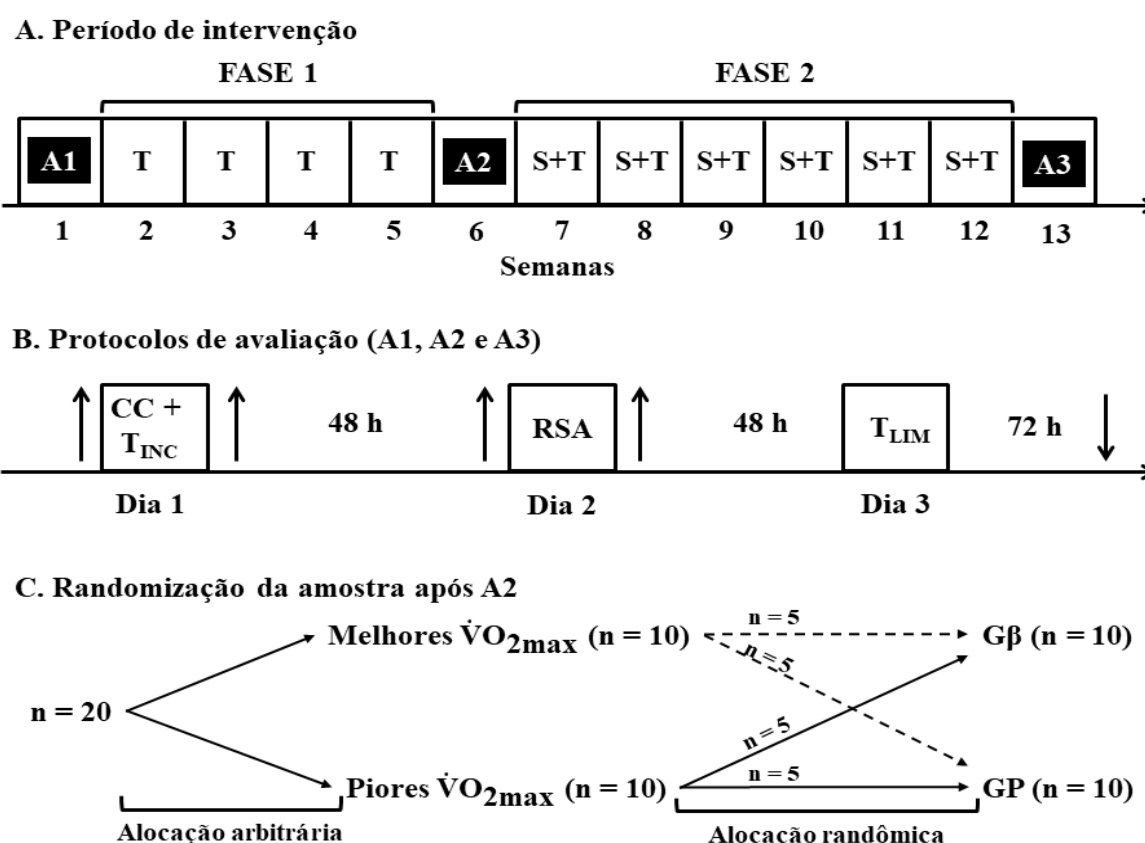


Figura 1. Desenho experimental do projeto. **A** – Período de intervenção. **A1** – Avaliações antes da FASE 1. **A2** – Avaliações antes da FASE 2. **A3** – Avaliação após FASE 2. **T** – Período de HIIT. **S+T** – Período de suplementação + HIIT. **B** – Protocolos de avaliação. **CC** – Avaliação da composição corporal. ↓ - Biópsia muscular (ocorreram somente após A2 e A3). ↑ - Avaliações neuromusculares. **T_{INC}** – Teste incremental até exaustão. **RSA** – Capacidade de *sprints* repetidos. **T_{LIM}** – Tempo limite até exaustão. **C** – Randomização da amostra.

5.3. Composição corporal

Para a análise da composição corporal e da distribuição das massas magra, óssea e tecido adiposo, foi realizado exame de absorptiometria de raios-X de dupla energia (DXA Discovery - Hologic - EUA). A dose de radiação que os participantes receberam foi menor do que 0,05 mrem, ou seja, equivalendo a 50 vezes menos a realização de um exame de raio X.

O método estimou a composição corporal fracionando o corpo em três compartimentos anatômicos: massa livre de gordura, massa de gordura e conteúdo mineral ósseo. Os resultados foram expressos em kilogramas de peso corporal (PC), massa magra (MM) e massa de gordura (MG), além do percentual de gordura corporal (%Gord).

5.4. Teste incremental (T_{INC})

Os testes incrementais para avaliação da capacidade cardiorrespiratória foram realizados em esteira ergométrica (ATL, Inbramed, Porto Alegre, RS, Brasil) com velocidade inicial de 8 km.h⁻¹ e incrementos de 1,5 km.h⁻¹ a cada estágio de 2 min até a exaustão, determinada voluntariamente pelo participante ou pela incapacidade de realizar o esforço na velocidade pré-determinada (MILIONI et al., 2016b). A escala de Borg (6-20) foi utilizada para avaliar a percepção subjetiva de esforço (PSE) ao final de cada estágio e amostras de sangue foram coletadas no 3º, 5º e 7º minutos após o término do teste para determinação da concentração pico de lactato ([La]_{pico}).

A maior média do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) dos últimos 30 s de cada estágio foi considerada como $\dot{V}O_{2max}$, considerando a verificação de pelo menos dois dos critérios a seguir: platô no $\dot{V}O_2$ (variação no $\dot{V}O_2 < 2,1 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ entre o último e o penúltimo estágio de exercício); FC máxima (FC_{max}) $\geq 90\%$ da FC_{max} predita (220-idade); quociente respiratório (RER) $\geq 1,10$ e lactato pico $\geq 8,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (HOWLEY; BASSETT; WELCH, 1995). Caso não fossem

observados ao menos dois critérios para confirmação do $\dot{V}O_{2max}$, um novo teste seria aplicado, contudo o presente estudo apresentou 100% de eficiência na determinação das variáveis provenientes do T_{INC} . A menor intensidade de exercício onde o voluntário atingisse o $\dot{V}O_{2max}$ foi considerada como $i\dot{V}O_{2max}$, considerando a intensidade de exercício do estágio completo ou ajustada de acordo com Kuipers et al. (1985). A máxima velocidade atingida no T_{INC} foi assumida como V_{max} .

5.5. Teste de capacidade de *sprints* repetidos (RSA)

A capacidade de realizar *sprints* repetidos foi mensurada por meio do *Running-Based Anaerobic Sprint Test* (RAST) (ZAGATTO; BECK; GOBATTO, 2009), protocolo que consiste em seis *sprints* de 35 m intercalados por período de 10 s de recuperação passiva.

O RAST foi realizado duas vezes com intervalo de 4 min entre eles. Os *sprints* foram gravados em vídeo por duas câmeras (GoPro Hero 3+ Black, San Mateo, Califórnia, EUA) posicionadas lateralmente à pista, de modo que cada câmera capturasse 17,5 m da pista. Sensores ópticos que emitiam luz e um bipe quando os participantes passavam foram posicionados nas linhas de chegada. Os tempos de *sprint* foram analisados usando o *software* Kinovea (Kinovea 0.8.15 para Windows; disponível em <http://www.kinovea.org/>). Foram obtidos os valores de tempo total (Tempo Total – somatória dos tempos dos 12 *sprints*), melhor tempo (Melhor Tempo – valor do melhor *sprint* registrado), e índice de fadiga (Índice de Fadiga % = $100 \times (\text{Tempo Total} / (\text{Melhor Tempo} \times 12)) - 100$) (FITZSIMONS et al., 1993).

Foram coletadas amostras de sangue capilarizado do lóbulo da orelha previamente ao início do protocolo (em repouso) e 3°, 5° e 7° min após o RSA.

5.6. Teste de tempo limite até exaustão (T_{LIM})

Previamente aos esforços, os participantes permaneceram sentados por 10 min para determinação dos valores de linha de base de $\dot{V}O_2$ ($\dot{V}O_{2\text{base}}$) e lactato sanguíneo. Os participantes foram submetidos a corrida contínua em esteira ergométrica (ATL, Inbramed, Porto Alegre, RS, Brasil) em intensidade correspondente a 115% da V_{max} ($115\%V_{\text{max}}$) até a exaustão voluntária (MILIONI et al., 2016b; ZAGATTO et al., 2016). A intensidade do T_{LIM} ($115\%V_{\text{max}}$) foi fisiologicamente pareada em todos os momentos (A1, A2 e A3), ou seja, era referente aos resultados do T_{INC} respectivo e não ao valor obtido na primeira avaliação. O tempo limite até exaustão (Tempo Limite) foi mensurado imediatamente ao término do teste, o $\dot{V}O_2$ continuou sendo mensurado durante 7 - 10 min (até a estabilização do $\dot{V}O_2$ em nível 2 - 3 mL.kg⁻¹.min⁻¹ acima do $\dot{V}O_{2\text{base}}$) para a determinação da fase rápida do excesso de consumo de oxigênio ao final do exercício (EPOC_{rápido}). Amostras de sangue foram coletadas do lóbulo da orelha previamente ao protocolo e no 3º, 5º e 7º minutos após o término do teste para determinação da [La]_{pico}.

A Capacidade Anaeróbia foi estimada por meio da soma das contribuições dos metabolismos glicolítico e de fosfagênio (BERTUZZI et al., 2010; MILIONI et al., 2016b; MIYAGI et al., 2017; ZAGATTO et al., 2016). O EPOC_{rápido} foi utilizado para estimar a contribuição do metabolismo dos fosfagênios, assumido como o produto entre a amplitude 1 (A1) pela constante de decaimento 1 (τ_1) da curva do EPOC_{rápido} ajustada biexponencialmente (OriginPro 8.0 software - OriginLab Corporation, Microcal, Massachusetts, EUA) (MIYAGI et al., 2017; ZAGATTO et al., 2016). A contribuição do metabolismo glicolítico foi estimada por meio da variação absoluta da concentração de lactato sanguíneo (concentração final menos concentração inicial), considerando para cada 1 mmol.L⁻¹ da variação de lactato sanguíneo o equivalente de 3 mL de O₂.kg⁻¹ (DI PRAMPERO; FERRETTI, 1999) (Figura 2).

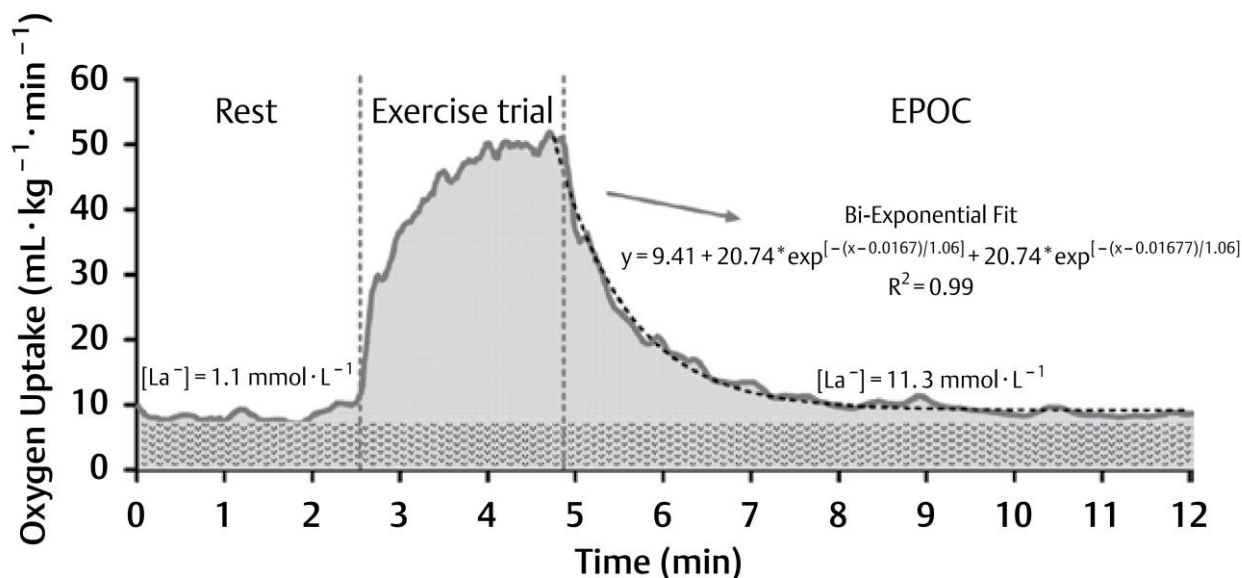


Figura 2. Respostas do consumo de oxigênio e concentração de lactato sanguíneo em repouso, esforço supramáximo a $115\%V_{\max}$ e mensuração do $EPOC_{\text{rápido}}$ por meio de um ajuste bi-exponencial. A linha contínua corresponde ao consumo de oxigênio e a linha tracejada corresponde ao ajuste bi-exponencial usado para determinação da amplitude e da constante de tempo para estimar o metabolismo dos fosfagênicos. A área hachurada corresponde ao $\dot{V}O_{2\text{base}}$. (Reproduzido com permissão de ZAGATTO et al., 2016)

5.7. Determinação das variáveis fisiológicas

Ventilação, $\dot{V}O_2$ e produção de CO_2 ($\dot{V}CO_2$) foram mensuradas respiração-a-respiração no T_{INC} e T_{LIM} por analisador de gases estacionário (Quark CPET, Cosmed, Roma, Itália). Previamente a todos os testes o analisador de gases foi calibrado a partir alíquotas de ar ambiente e concentração de gases conhecida (5,06 % CO_2 and 16,02 % O_2 , White Martins Ltda, Osasco, SP, Brasil). O pneumotacógrafo foi calibrado utilizando-se seringa de 3 L (Hans Rudolph, Kansas City, MO, EUA), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. A FC foi mensurada utilizando monitor de frequência cardíaca (Polar, Kempele, Finlândia) sincronizado com o analisador de gases.

Amostras de sangue capilarizado foram obtidas a partir de punção do lóbulo da orelha com lanceta picadora estéril para obtenção de 25 μL de sangue em capilares de vidro heparinizados e previamente calibrados. Imediatamente após as coletas, o sangue foi depositado em tubos *ependorf* contendo 50 mL de fluoreto de sódio (NaF – 1%) e então armazenados a -20°C para

posterior análise da concentração sanguínea de lactato ([La]) em analisador eletroquímico YSI 2900 (Yellow Spring Instruments, Yellow Spring, OH, EUA). As amostras de sangue coletadas em repouso durante RSA e T_{LIM} também foram analisadas em relação à concentração de glicose sanguínea.

5.8. Avaliação Neuromuscular

Previamente (em repouso) ao T_{INC} e RSA e imediatamente após (em estado fadigado) os participantes realizaram uma série de três saltos verticais com 1 min de intervalo entre saltos seguida de série de três contrações isométricas voluntárias máximas de extensão de joelho (CVM) e estimulação elétrica periférica também com 1 min de intervalo entre CVMs.

Saltos verticais: Os participantes foram solicitados a realizarem sequência de três saltos verticais contra o movimento (*counter movement jump*) em uma plataforma de salto vertical (Jump Test, CEFISE, Nova Odessa, SP, Brasil), sendo que para quantificação da *performance* de saltos verticais foram consideradas as tentativas que atingiram os maiores valores de altura. Os participantes foram instruídos a iniciar os movimentos com joelhos e quadril estendidos e com as mãos na cintura (as mãos deveriam ficar permanentemente junto à cintura), flexionar os joelhos e quadril a 90° e estender o mais rápido possível para a realização do movimento de salto o mais alto possível; e então aterrissar com os joelhos estendidos. Para limitar o grau de flexão dos joelhos, um sensor óptico foi ajustado posteriormente aos participantes de maneira a identificar a altura exata de 90° de flexão e emitir sinal sonoro (“beep”) quando essa amplitude fosse atingida. Nesse mesmo momento os participantes iniciavam o movimento para realizar o salto vertical.

Eletromiografia e força isométrica: Os participantes realizaram três CVMs com 5 s de duração e 1 min de intervalo entre elas, sendo que para quantificação da *performance* neuromuscular foram consideradas as tentativas que atingiram maiores valores de força pico

(F_{pico}). Para tanto, os participantes foram posicionados em uma cadeira desenhada especificamente para essa análise mantendo flexão dos joelhos e quadril a 90° com o tórax e coxas firmemente fixados por fitas transpassadas. Um fio de aço inextensível foi acoplado ao tornozelo da perna dominante e conectado a uma célula de carga (SDK200, Miotec, Porto Alegre, RS, Brasil) posicionada na parte posterior da cadeira para monitoramento da força isométrica. Também foi monitorada a atividade eletromiográfica, dos músculos vasto lateral (VL) e bíceps femoral (BF) (Miotool 400, Miotec, Porto Alegre, RS, Brasil). Os equipamentos (célula de carga e fio inextensível) foram previamente calibrados a partir de pesos conhecidos e os sinais (força e EMG) foram coletados em 2000 Hz, com ganho de 1000x, por meio da utilização de *software* dedicado do eletromiógrafo (Miograph 2.0, Miotec, Porto Alegre, RS, Brasil).

Foram utilizados eletrodos passivos de Ag/AgCl (3M, São José do Rio Preto, SP, Brasil) em configuração bipolar e com distância de 2,5 cm de centro-a-centro. Os eletrodos foram posicionados de acordo com as especificações da *Surface ElectroMyoGraphy for the Non-Invasive Assessment of Muscles* (SENIAM) na pele previamente tricotomizada e assepsiada por leve abrasão com lixa fina e álcool 70%. O eletrodo de referência foi fixado à altura do processo estilóide da ulna e as tentativas foram coletadas somente após inspeção visual da linha de base do sinal eletromiográfico. O posicionamento dos eletrodos foi demarcado para permitir precisa reprodutibilidade do posicionamento dos eletrodos antes e após os protocolos de testes.

O sinal eletromiográfico foi filtrado em filtro passa-banda 20-500 Hz e então foi determinado o valor pico de *root mean square* (RMS) referente a 1 s do pico de força. Já o sinal de força foi filtrado em filtro *Butterworth* de 4ª ordem e frequência de corte de 15 Hz. Para análise dos sinais EMG e força, foi desenvolvido algoritmo em ambiente MatLab 9.0 (MathWorks, Natick, MA, EUA) especificamente para esse propósito.

Estimulação elétrica neuromuscular: Durante o protocolo de investigação neuromuscular, foram aplicados estímulos elétricos no nervo femoral durante as CVMs e também no músculo relaxado. A técnica consistiu da aplicação de pulsos elétricos retangulares, simples e duplos, de alta e baixa frequência, supramáximos, de curta duração e alta voltagem (400 V pico a pico) (Bioestimulador, Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Inicialmente, o local de maior sensibilidade do nervo femoral foi identificado a partir da utilização de corrente contínua em baixa intensidade e então foram posicionados eletrodos de eletroestimulação de 5 cm X 5 cm (Arktus, Santa Tereza do Oeste, PR, Brasil) na dobra glútea (ânodo) e no triângulo femoral (cátodo). Para definição do limiar de estimulação (valor de corrente elétrica a ser aplicada), previamente ao início dos protocolos de testes os participantes foram submetidos a estímulos elétricos consecutivos e incrementais (incrementos de 10 mA) com o músculo relaxado, até o momento no qual o platô de força fosse atingido (ou seja, mesmo com o aumento da intensidade da corrente elétrica, o valor de força produzido pela estimulação no músculo relaxado não aumentava) ou o voluntário reportasse desconforto não tolerável dos estímulos elétricos. Em 100% das ocasiões o platô de força foi atingido. Após definido o limiar de estimulação, a intensidade foi aumentada em 20% para garantir estimulações supramáximas (GIRARD; BISHOP; RACINAIS, 2013). Esse protocolo foi aplicado em todos os dias em que as avaliações neuromusculares ocorreram e de maneira individual.

A sequência de estímulos elétricos aplicados foi: pulsos duplos de 100 Hz durante o pico de força das CVMs (*twitch* superimposta – TS [mensurado como a amplitude do sinal de força acima da F_{pico}]), pulsos duplos de 100 Hz 5 s após a realização das CVMs (*twitch* de alta frequência - T_{HF} [mensurado como a amplitude do sinal de força]), pulso simples 10 s após as CVMs (*twitch single* – T_{s} [mensurado como a amplitude do sinal de força]) e pulso duplo de 10 Hz 30 s após a CVM (*twitch* baixa frequência - T_{LF} [mensurado como a amplitude do sinal de força]). A ativação voluntária foi calculada por meio da fórmula $AV = 1 - (TS \times (\text{nível de força no momento da$

estimulação / $F_{\text{pico}} / T_{\text{HF}} \times 100$ (Neyrod 2013). A T_{S} foi utilizada para a mensuração da amplitude pico a pico da *M-Wave* (inspeção visual do sinal eletromiográfico) que trata-se da máxima capacidade de transmissão/propagação do potencial de ação ao longo do sarcolema, além de normalizar um possível déficit central representado pela queda da RMS (RMS/MW); e a T_{LF} foi utilizada para a investigação da fadiga neuromuscular de fibras musculares de contração lenta (Figura 3).

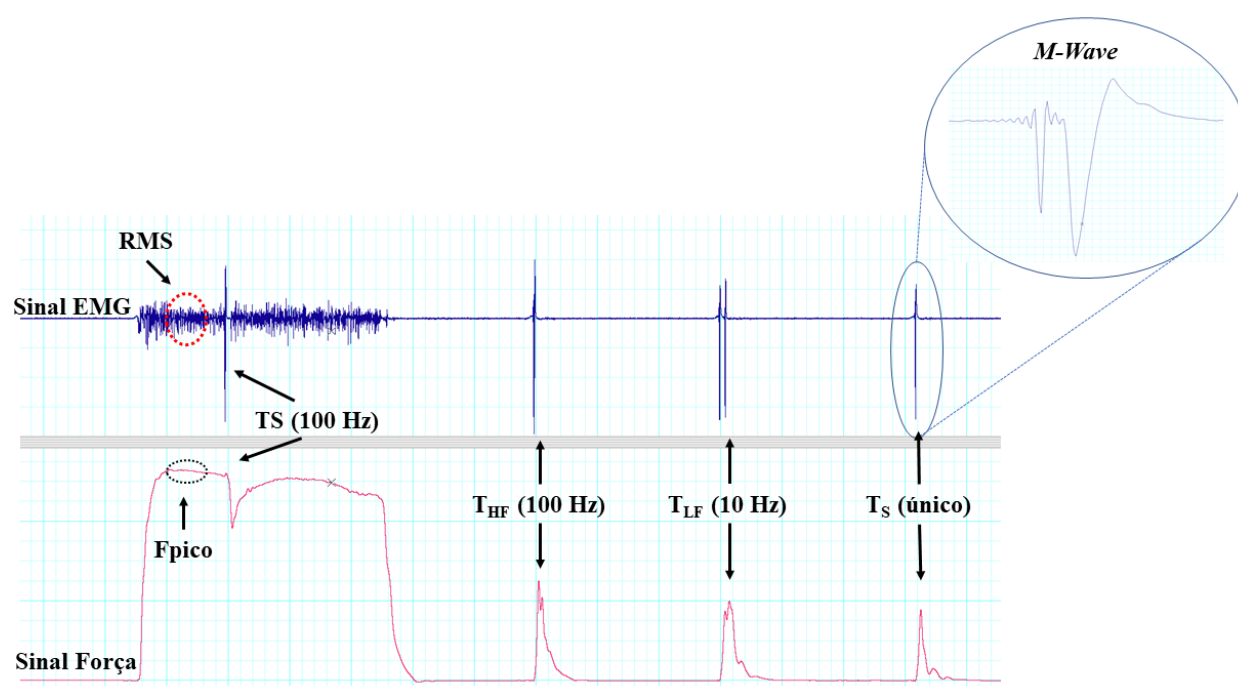


Figura 3. Esquema representativo dos sinais de força e eletromiográfico durante as avaliações neuromusculares.

5.9. Treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT)

Os participantes realizaram durante 10 semanas treinamento intervalado de alta intensidade, sendo apenas as últimas seis semanas associadas com a suplementação. Adaptado de Little et al. (2010), as sessões foram compostas de dez corridas de 1 minuto a 90% da V_{max} em esteira ergométrica (ATL, Inbramed, Porto Alegre, RS, Brasil) intercaladas por 1 minuto de repouso passivo. A frequência semanal de treinos foi de 2 – 3 sessões semanais com no mínimo

36 h de intervalo entre as sessões. Os participantes completaram 11 sessões de treino nas quatro primeiras semanas (FASE 1) e 17 sessões nas seis últimas semanas (FASE 2). A carga foi monitorada pela FC e PSE utilizando escala de Foster 1-10 (FOSTER, 1998) ao final de cada corrida.

Apesar da intensidade inicial ser 90% da V_{max} , os participantes deveriam atingir 90% da FC_{max} na média das últimas 5 corridas de cada sessão de treino. Se esse valor não fosse atingido por duas sessões consecutivas de treino, a intensidade era incrementada em 5% da V_{max} . Durante a FASE 2, os participantes foram submetidos a um novo T_{INC} para adequação das intensidades de treino entre as sessões 8 e 9 de treinamento.

5.10. Recordatório alimentar

Previamente ao início da FASE 2, os participantes foram solicitados a preencher inquérito alimentar durante três dias não consecutivos (dois dias de semana e um dia de final de semana) para mensuração do consumo de proteína na dieta. Os participantes foram orientados sobre a maneira correta de reportar os tipos e quantidades de alimentos ingeridos nos dias de preenchimento do inquérito. O consumo proteico foi analisado através do *software* Nutrilife (São Paulo, SP, Brasil).

5.11. Protocolo de suplementação

Os participantes ingeriram $6,4 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}$ de β -Alanina (CarnoSyn β -Alanine, NAI, EUA) ou substância placebo (dextrose sem sabor, Max Titanium, Supley, Matão, SP, Brasil) administrados via oral em cápsulas de 800 mg gastro-resistentes, revestidas com hidroxipropil-metilcelulose

(DRcaps, Capsugel, França), juntamente com as refeições (duas cápsulas por refeição – café da manhã, almoço, jantar e ceia) para evitar que uma superdose gerasse parestesia (momentânea alteração da sensação da pele com ligeiro formigamento). Essa dosagem está em acordo com revisão de literatura de Hobson et al. (2012), que verificaram efeito significativo da suplementação de β -Alanina na *performance* a partir do acúmulo de aproximadamente 179 g de β -Alanina. Dextrose foi utilizada como substância placebo por não apresentar nenhum efeito benéfico à *performance* na dosagem usada no presente estudo (BAKER et al., 2015).

Na quinta semana de suplementação, um voluntário (pertencente ao GP) foi excluído do estudo por impossibilidade de manter o protocolo de suplementação. Exceto o voluntário excluído, os demais participantes foram rigorosamente monitorados e apresentaram nível de aderência ao protocolo de suplementação de 100% de eficácia (todas as pílulas ingeridas no período designado).

5.12. Biópsia muscular

A biópsia muscular foi realizada por punção com agulhas de Bergstrom modificadas, com 5 mm de diâmetro. As mesmas foram esterilizadas e autoclavadas em ambiente hospitalar previamente a todos os procedimentos, os quais foram realizados em sala específica para pequenas cirurgias por um médico responsável, assistido por um Doutor assistente.

Inicialmente, foi realizada assepsia na região ântero-lateral da perna, abrangendo o ventre do músculo vasto lateral. A seguir, realizou-se bloqueio anestésico com injeção subcutânea de 3-5 mL de cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor. Em condições estéreis, uma incisão com bisturi cirúrgico de aproximadamente 0,5 - 1,0 cm foi feita na derme e fáscia muscular, paralelamente ao sentido das fibras musculares. Em seguida, o componente da agulha contendo o

cilindro de corte foi inserido em direção ao músculo expondo a janela lateral. Imediatamente, o assistente aplicou sucção no local utilizando uma seringa de 60 mL acoplada a parte posterior da agulha por uma cânula de aspiração de silicone. Nesse momento, uma amostra de cerca de 60 – 100 mg foi então seccionada para o lúmen da agulha, e logo após o fragmento coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C. A média das amostras obtidas em A2 e A3 foram $99,5 \pm 42,9$ g e $111,2 \pm 29,4$ g, respectivamente.

Após o procedimento, o local da incisão foi protegido por curativo estéreo simples (Steri-Strip - 3M, São José do Rio Preto, SP, Brasil) e uma bandagem foi mantida no local por aproximadamente 72h para evitar a formação de edema (Tegaderm - 3M, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Segundo Neves et al. (NEVES et al., 2012), são escassos os casos de complicação devido ao procedimento de biópsia, sendo poucas ocorrências reportadas e casos de menor relevância clínica (dor ~1,27% dos casos e equimose ~1,27% dos casos). No presente estudo foram realizadas 37 biópsias (20 em A2 e 17 em A3) e foram reportados 3 casos de ligeira vermelhidão ao redor do local da incisão realizada, possivelmente em função de resposta alérgica ao curativo utilizado.

Previamente ao início da FASE 2 (em A2), 20 participantes realizaram a biópsia muscular e ao final da FASE 2 (em A3), 17 participantes realizaram biópsia muscular. Excetuando o voluntário que foi excluído por não aderência ao protocolo de suplementação, as demais perdas amostrais ocorreram por livre-arbítrio dos participantes que optaram por não realizar a segunda biópsia.

5.13. *High-performance liquid chromatographic (HPLC)*

O conteúdo total de carnosina muscular foi determinado por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC - Hitachi, Hitachi Ltd., Tóquio, Japão) em temperatura ambiente segundo as recomendações de Mora, Sentandreu e Toldrá (2007). As amostras foram injetadas automaticamente (volume total aspirado de 10 μL), sendo que antes de todas as injeções, as amostras foram visualmente inspecionadas e as bolhas de ar foram removidas manualmente.

Foi utilizada coluna de sílica Atlantis HILIC ($4,6 \times 150$ mm, 3 μm) (Waters, MA, EUA) acoplada a um protetor de coluna Atlantis Silica ($4,6 \times 20$ mm, 3 μm) e curvas padrão para carnosina foram determinadas antes de cada sessão de análise usando concentrações de 0,05, 0,1, 0,5, 1 e 2,5 ($R^2 = 0,995$). O método usou duas fases móveis, sendo a fase móvel A composta por acetato de amônio 0,65 mM, em água/acetonitrila (razão de volume de 25:75); e a fase móvel B composta por acetato de amônio 4,55 mM, em água/acetonitrila (razão de volume de 70:30). O pH de ambas as soluções foi ajustado para 5,5 usando ácido clorídrico e depois filtrado através de uma membrana de filtro de 0,2 μm com utilização de uma bomba à vácuo.

A condição de separação compreendeu um gradiente linear de 0 a 100% do solvente B em 13 min a uma vazão de 1,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A separação foi monitorada utilizando um detector ultravioleta a um comprimento de onda de 214 nm. Previamente a cada injeção, a coluna foi equilibrada durante 5 min sob as condições iniciais. A quantificação dos picos foi realizada por software acoplado ao equipamento e inspecionadas individualmente quanto a erros e consistência. As áreas dos picos foram plotadas e uma equação de regressão obtida, a partir da qual as interpolações foram usadas para calcular o conteúdo muscular de carnosina. Ainda, dez amostras aleatórias foram quantificadas em duplicata para verificação do coeficiente de variação do ensaio ($\text{CV} = 6,5\%$) (Figura 4).

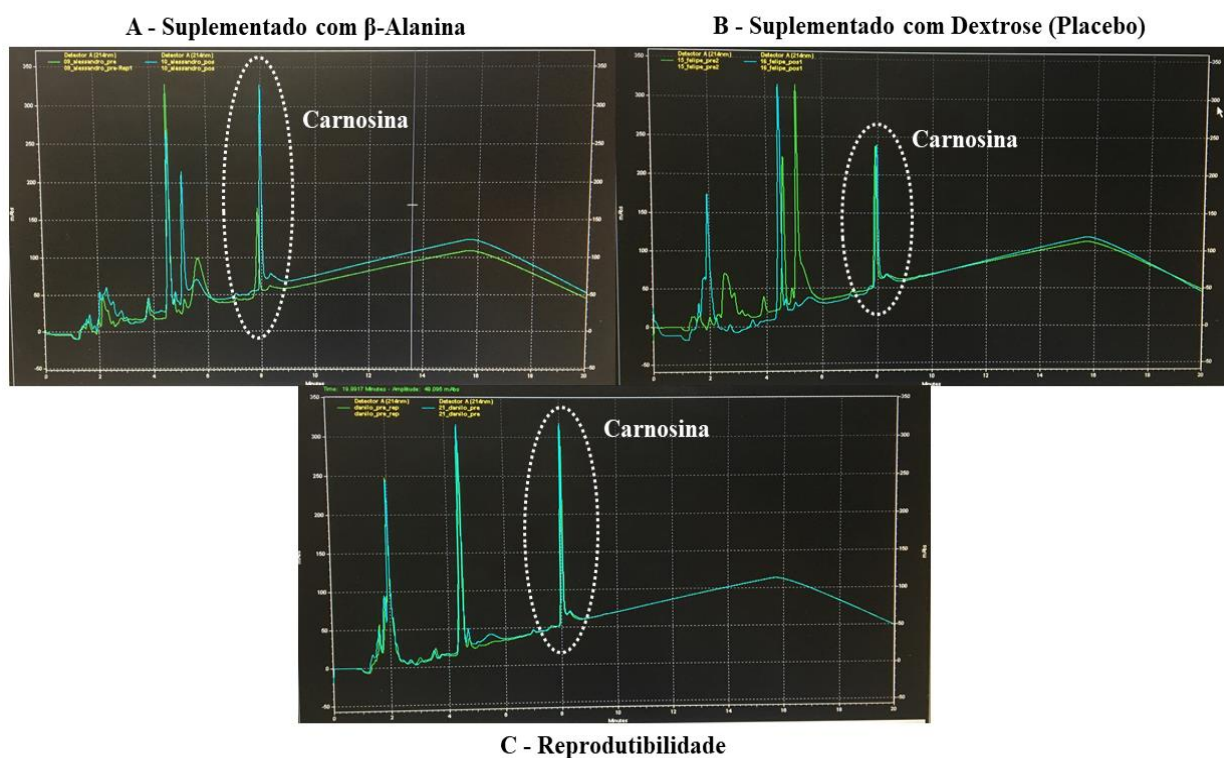


Figura 4. Curvas representativas das dosagens de carnitina intramuscular via HPLC. **A** – Participantes suplementado com β -Alanina. **B** – Participante suplementado com dextrose (Placebo). **C** – Amostra quantificada em duplicata para determinação da reprodutibilidade do ensaio. Traço verde representa a dosagem de carnitina intramuscular em A2. Traço azul representa a dosagem de carnitina intramuscular em A3.

5.14. Mensuração do conteúdo proteico/enzimático via *western blots*

As amostras do vasto lateral foram homogeneizadas em tampão de extração (1% de Triton X- 100, 100 mM Tris, pH 7,4, contendo 100 mM de pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg.ml⁻¹ aprotinina) a 4°C. Os extratos foram centrifugados (9900 g) durante 40 min a 4°C para remover o material insolúvel, e foi quantificado o conteúdo total de proteínas dos sobrenadantes utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

As proteínas foram desnaturadas por fervura em tampão de amostra de *Laemmli* contendo DTT 100mM, executado em gel SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE

Healthcare, Hybond ECL, RPN303D). A eficiência da transferência para membranas de nitrocelulose foi verificada por coloração breve das bandas com Ponceau. Estas membranas foram então bloqueadas com solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo 5% de BSA e 0,1% de Tween-20, durante 1 hora, a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo específico (MCT4, PFK, LDH, HIF-1 α , PGC-1 α e GAPDH) e 16 h após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas 5 vezes durante 5 min com TBS contendo 0,1% de tween-20, e então incubadas durante 1 hora a 4°C com anticorpo secundário. As bandas imunorreativas específicas foram detectadas por chemiluminescence (GE Healthcare, ECL Signal Fire, Cell Signaling, MA, EUA). As imagens foram adquiridas por ChemiDoc XRS Imaging System (BioRad) e quantificadas utilizando *software* Image Lab 3.0. Os anticorpos específicos de cada proteína foram adquiridos das empresas *Cell Signalling Technology* (Cell Signalling Technology, MA, EUA), *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA) e *Upstate Biotechnology* (Upstate Biotechnology, NY, EUA), de acordo com a disponibilidade. Os reagentes químicos de rotina foram provenientes da *Sigma Chemical Corporation* (St. Louis, MO, EUA).

O conteúdo proteico/enzimático mensurado em cada momento (A2 e A3) foi devidamente normalizado pelo respectivo conteúdo da proteína padrão (GAPDH) para facilitação da visualização de possíveis mudanças induzidas pela intervenção.

5.15. Determinação da capacidade de tamponamento *in vitro* ($\beta_{m_{in vitro}}$)

Os procedimentos para a determinação da capacidade de tamponamento muscular *in vitro* seguiram procedimento proposto por Bishop et al. (2008). Uma pequena alíquota de músculo seco (~1,8 – 3,0 mg) foi homogenizado em uma solução de fluoreto de sódio (NaF – 10mM) (33 μ L de NaF.g músculo seco⁻¹). Esse homogenado foi mantido à 37°C e ajustado para um pH de 7,2

pelo acréscimo de NaOH (0,02 mM). O monitoramento do pH foi realizado por meio de microeletrodo de vidro (Microelectrodos, Mettler Toledo, Suíça) conectado a um pHmetro (FiveEasy Plus, Mettler Toledo, Suíça). O homogenado foi então titulado por uma sequência de adições de 2 μL de HCl (10 mM) até atingir um pH de 6,2 – 6,1. A partir desses dados, foi interpolada a quantidade de moles de HCl necessários para alterar o pH de 7,2 para 6,5 e ajustada pela quantidade de músculo seco aliquotada na amostra para a determinação da $\beta_{m_{in\ vitro}}$ (Figura 5).

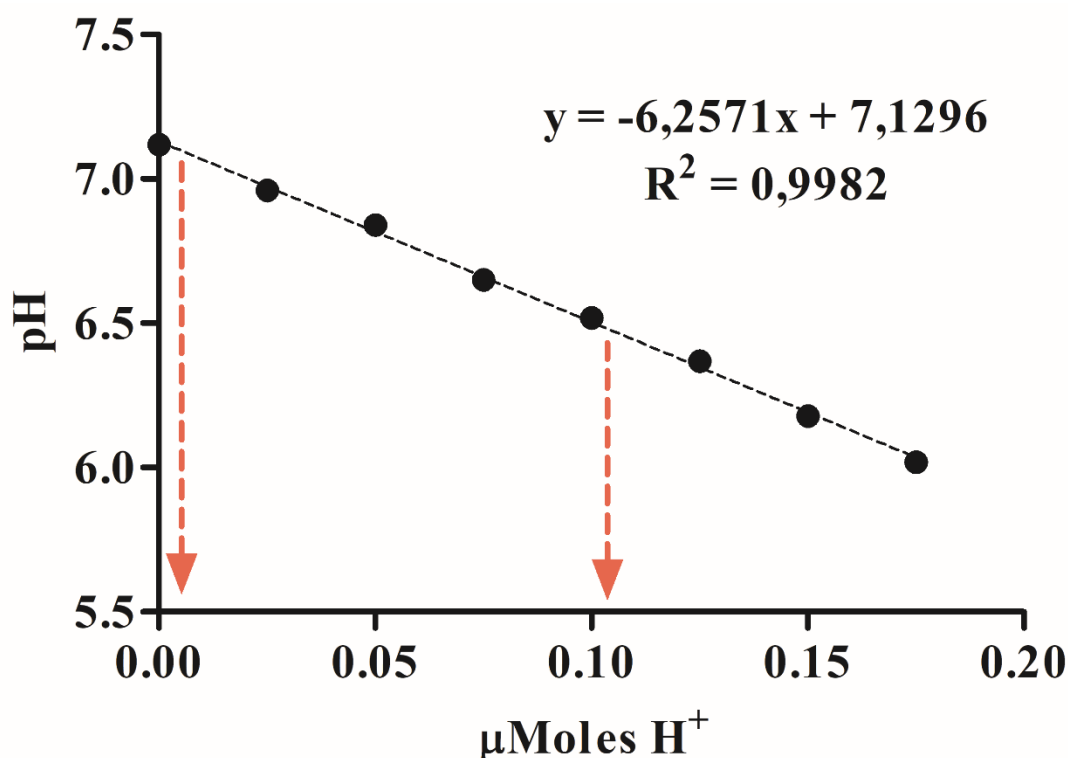


Figura 5. Curva representativa da regressão linear criada entre a quantidade de HCl titulado e o pH medido. Setas vermelhas representam o ΔH^+ entre os valores de pH de 7,1 e 6,5.

5.16. Análise estatística

Os dados foram reportados em média e desvio padrão (DP). Todos os dados foram confirmados como normais (teste de Levene) e homogêneos (teste de Shapiro-Wilks). Para análise da FASE 1 (n = 19; em função do voluntário excluído) foram aplicados teste *t* de *student* pareado para verificar possíveis diferença entre os momentos A1 vs. A2 (variáveis de composição

corporal, do T_{INC} , do RSA, do T_{LIM} e variações absolutas [$\Delta = \text{Pós} - \text{Pré}$]). A análise de variância (ANOVA *two way*) de dois fatores foi utilizada para verificar as possíveis diferenças das variáveis de salto vertical e neuromusculares entre condições (Pré vs. Pós) e entre momentos (A1 vs. A2).

Para análise da FASE 2 (GP: n = 9; G β : n = 10) foram aplicadas análise de variância (ANOVA *two way*) de dois fatores para verificação de possíveis diferenças nas variáveis de composição corporal, T_{INC} , RSA, T_{LIM} e biomoleculares entre momentos (A2 vs. A3) e entre grupos (GP vs. G β); e análise de variância (ANOVA *two way*) de três fatores para verificação de possíveis diferenças nas variáveis de salto vertical e neuromusculares entre condições (GP Pré, GP Pós, G β Pré e G β Pós), entre momentos (A2 vs. A3) e entre grupos (GP vs. G β). Para análise das variações absolutas entre grupos, foi utilizado o teste *t* de *student* não-pareado.

Todas as ANOVAs foram verificadas quanto à esfericidade por meio de teste de Mauchly, a qual foi assumida quando valores não significativos de F foram observados. Em caso de violação da esfericidade, o fator de correção *Epsilon* de Greenhouse-Geisser foi utilizado. As análises foram concluídas com a aplicação do *post hoc* de Sidak. O nível de significância foi de 95% para todos os casos ($p < 0,05$) e as análises foram realizadas no SPSS 17.0 for Windows.

Adicionalmente, foi realizada a análise baseada na magnitude do efeito (HOPKINS et al., 2009) entre as médias dos grupos para as variáveis do T_{INC} , RSA e T_{LIM} . Os valores foram expressos como a diferença média padronizada (Cohen's *d*) (COHEN, 1988). A chance de efeito positivo, trivial ou negativo, foi calculado com base na menor mudança de valor prática (*smallest worthwhile change* - SWC; 0,2 multiplicado pelo desvio-padrão entre sujeitos). As alterações foram avaliadas qualitativamente, como <1% = o mais improvável; 1% - 5% = muito improvável; 5% - 25% = improvável; 25% - 75% = possível; 75% - 95% = provável; 95% - 99% = muito provável; e > 99% = certamente. Se a probabilidade do efeito ser positivo e negativo fossem > 5% ao mesmo tempo, o efeito foi reportado como não claro (HOPKINS et al., 2009).

6. RESULTADOS

6.1. FASE 1 (n = 19)

Composição corporal: Apenas o PC (p = 0,34) não apresentou diferenças significativas após a FASE 1. O %Gord (p = 0,03) e a MG (p = 0,02) diminuíram significativamente, enquanto a MM (p = 0,03) foi estatisticamente maior (Tabela 1).

Tabela 1. Média \pm DP da composição corporal A1 vs. A2.

	A1	A2	p	Δ
PC (kg)	74,2 \pm 8,0	74,0 \pm 7,8	0,34	-0,2 \pm 0,9
%Gord (%)	19,2 \pm 4,0	18,0 \pm 4,0 [#]	0,03	-1,2 \pm 2,2
MM (kg)	55,8 \pm 6,2	56,7 \pm 6,4*	0,03	0,9 \pm 1,6
MG (kg)	14,0 \pm 3,4	13,1 \pm 3,3 [#]	0,02	-0,9 \pm 1,6

[#]A2 < A1. *A2 > A1.

T_{INC} : $\dot{V}O_{2max}$ relativo (mL.kg⁻¹.min⁻¹) (p = 0,001), $\dot{V}O_{2max}$ absoluto (L.min⁻¹) (p = 0,001), V_{max} (p = 0,001) e [La]_{pico} (p = 0,01) foram maiores em A2 em comparação com A1. Ainda, a análise da magnitude do efeito apontou as inferências *Muito provavelmente positivo* para $\dot{V}O_{2max}$ relativo e absoluto, *Certamente positivo* para V_{max} e *Provavelmente positivo* para [La]_{pico} (Figura 6).

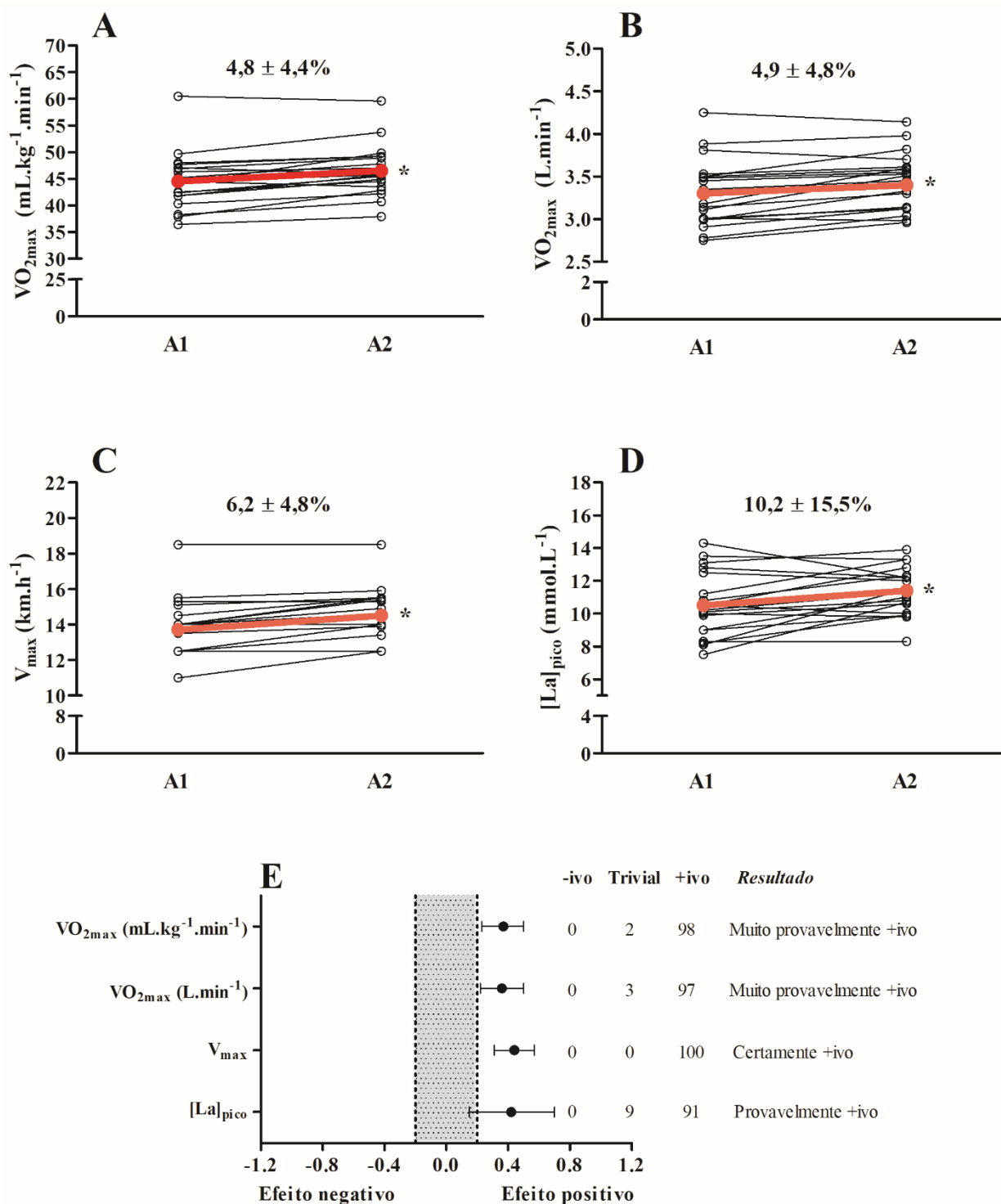


Figura 6. Influência da FASE 1 nas variáveis do T_{INC} (linha vermelha representa a adaptação média e número no topo reporta alteração percentual entre A1 e A2). **A** – $\dot{V}O_{2max}$ relativo. **B** – $\dot{V}O_{2max}$ absoluto. **C** – Velocidade máxima atingida no T_{INC}. **D** – Concentração pico de lactato sanguíneo. **E** – Análise baseada na magnitude do efeito. *A2 > A1.

Ao comparar a *performance* de saltos verticais, não houve diferença significativa quando comparado os momentos A1 e A2 ($F_{[1, 36]} = 2,41 - p = 0,13$), entretanto, verificou-se diminuição da altura máxima atingida Pós T_{INC} em A2 ($F_{[1, 36]} = 15,73 - p = 0,00$; *post hoc*: A1 - $p = 0,09$; A2 - $p = 0,00$). A variação absoluta da altura máxima atingida ($\Delta = \text{Salto Pós} - \text{Salto Pré}$) também sofreu diminuição significativa em A2 comparada a A1 (Figura 7).

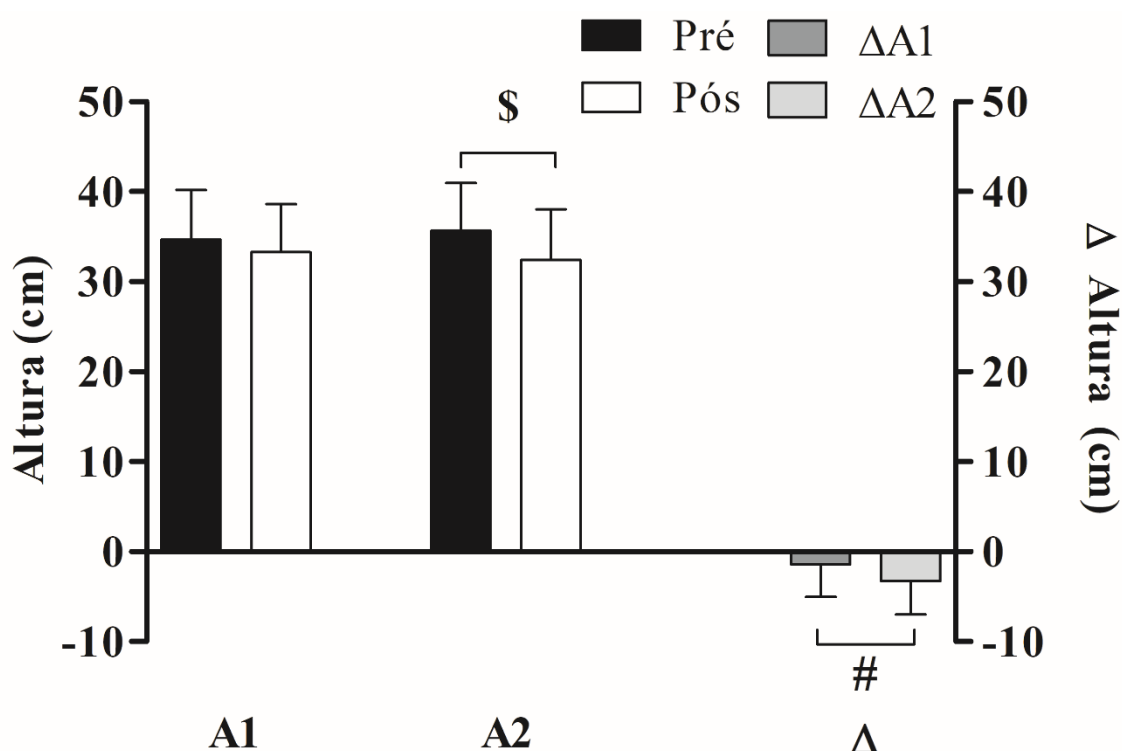


Figura 7. Efeito da FASE 1 na *performance* dos saltos verticais Pré e Pós T_{INC} . \$Pós < Pré. #A2 < A1.

Em relação às avaliações neuromusculares, não foram verificadas interações significativas entre A1 e A2 em nenhuma condição (Pré vs. Pós) ($F_{[1,36]} < 4,69 - p > 0,06$). Diminuição significativa foi verificada para todas as variáveis provenientes do sinal de força quando comparado Pré vs. Pós T_{INC} ($F_{[1,36]} > 21,70 - p < 0,00$) exceto para T_{HF} ($F_{[1,36]} = 0,90 - p = 0,35$). Quanto às variáveis EMG, a RMS_VL apresentou diminuição Pós T_{INC} tanto em A1 quanto em A2 ($F_{[1,36]} = 22,54 - p = 0,00$), já RMS_BF e RMS/MW apresentaram diminuição Pós T_{INC} apenas

em A1 ($F_{[1,36]} > 5,90 - p < 0,02$); e a *M-Wave* não sofreu alteração significativa em nenhuma condição analisada ($F_{[1,36]} = 1,06 - p = 0,31$). As variações absolutas de T_{LF} , e RMS_BF ($p < 0,04$) também apresentaram diferenças significativas, com aumento e diminuição das variações absolutas, respectivamente. (Tabela 2).

Tabela 2. Média \pm DP da avaliação neuromuscular Pré vs. Pós T_{INC} , A1 vs. A2.

	A1				A2			
	Pré	Pós	P (<i>post hoc</i>)	Δ	Pré	Pós	P (<i>post hoc</i>)	Δ
Força								
F_{pico}	641,8 \pm	606,8 \pm	0,00	-35,0 \pm	634,7 \pm	600,8 \pm	0,00	-33,9 \pm
(N)	96,2	95,9 ^s		46,1	73,9	67,7 ^s		45,0
T_{HF}	273,4 \pm	270,9 \pm	0,64	-2,6 \pm	274,5 \pm	269,9 \pm	0,39	-4,7 \pm
(N)	33,0	45,8		29,9	35,7	39,0		14,7
T_{LF}	241,1 \pm	183,3 \pm	0,00	-57,8 \pm	254,1 \pm	178,4 \pm	0,00	-75,7 \pm
(N)	37,2	41,8 ^s		26,5	33,8	41,9 ^s		27,1 [#]
AV	93,0 \pm	88,0 \pm	0,00	-4,9 \pm	92,1 \pm	87,2 \pm	0,00	-4,9 \pm
(%)	6,6	7,5 ^s		3,5	5,0	8,0 ^s		5,7
EMG								
RMS_VL	303,9 \pm	254,5 \pm	0,00	-49,4 \pm	274,4 \pm	253,1 \pm	0,04	-21,6 \pm
(μ V)	95,5	92,3 ^s		46,8	72,7	63,1 ^s		45,3
RMS_BF	38,8 \pm	32,1 \pm	0,01	-6,7 \pm	36,1 \pm	35,3 \pm	0,71	-0,8 \pm
(μ V)	19,3	14,1 ^s		10,9	12,7	12,9 ^s		7,8*
M-Wave	5,5 \pm	5,8 \pm	0,33	0,3 \pm	6,6 \pm	6,7 \pm	0,65	0,1 \pm
(mV)	1,3	1,1		1,1	1,7	1,8		1,3
RMS/MW	0,058 \pm	0,044 \pm	0,00	-0,013 \pm	0,046 \pm	0,042 \pm	0,28	-0,003 \pm
(U.A.)	0,022	0,016 ^s		0,017	0,021	0,021		0,016

^sPós < Pré. #A2 < A1. *A2 > A1.

RSA: Apenas o Índice de Fadiga apresentou diminuição significativa em A2 ($p = 0,02$). Tempo Total ($p = 0,55$), Melhor Tempo ($p = 0,27$), Pior Tempo ($p = 0,07$), Tempo Médio ($p = 0,49$) e $[La]_{pico}$ ($p = 0,07$) não foram estatisticamente diferentes. Em relação à análise da magnitude do efeito, foram verificadas inferências *Possivelmente positivo* para Tempo Total e Tempo Médio, *Possivelmente negativo* para Melhor Tempo e *Provavelmente positivo* para Pior Tempo, Índice de Fadiga e $[La]_{pico}$ (Figura 8).

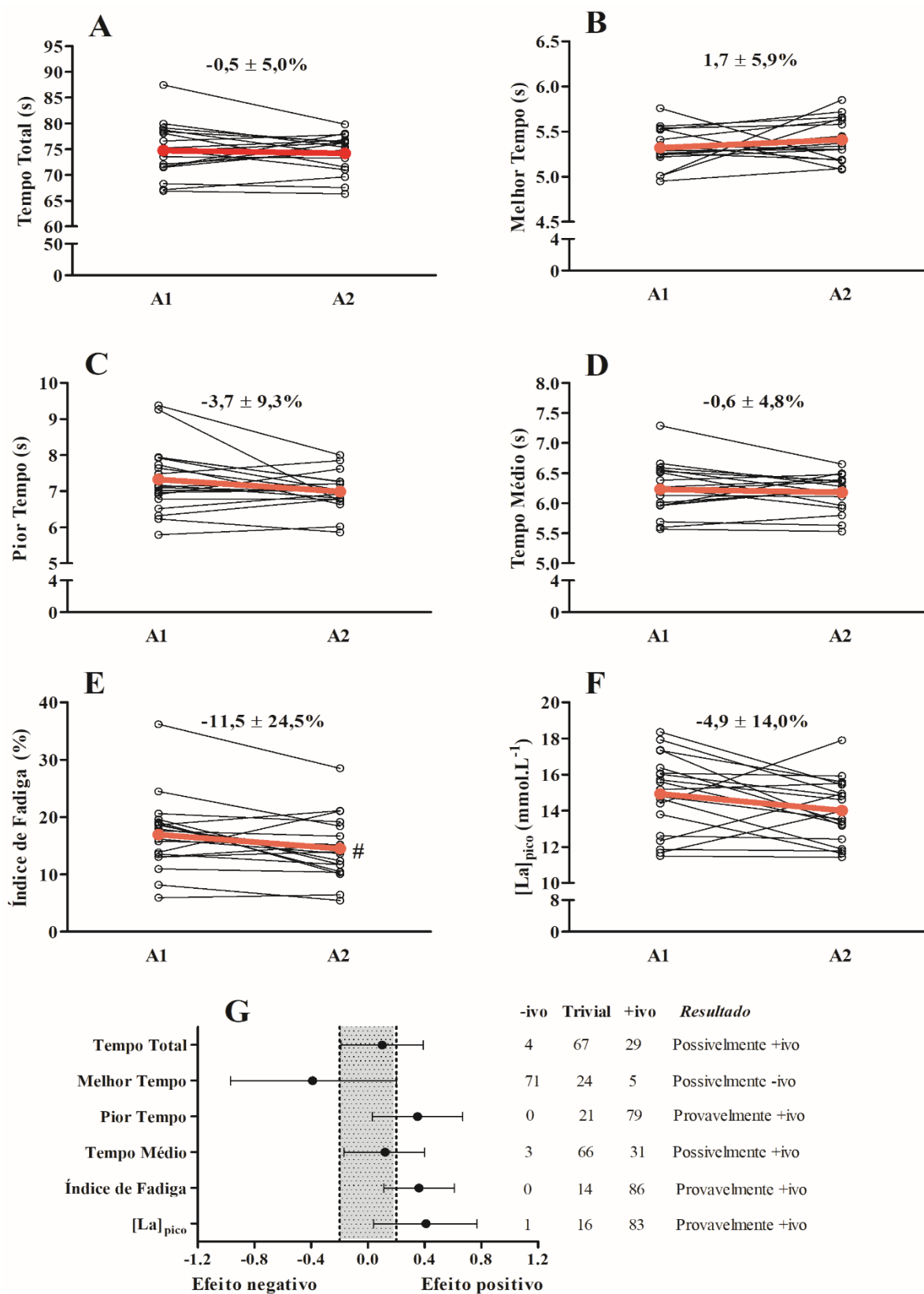


Figura 8. Efeito da FASE 1 nas variáveis do RSA (linha vermelha representa a adaptação média e número no topo reporta alteração percentual entre A1 e A2). **A** – Tempo total. **B** – Melhor tempo. **C** – Pior Tempo. **D** – Tempo Médio. **E** – Índice de fadiga. **F** - Concentração pico de lactato sanguíneo. **G** - Análise baseada na magnitude do efeito. #A2 < A1.

Em relação aos saltos verticais, não houve interação entre os momentos ($F_{[1,36]} = 1,43 - p = 0,24$), contudo, verificou-se diminuição da altura máxima atingida Pós RSA em ambos momentos ($F_{[1,36]} = 130,2 - p = 0,00$; *post hoc*: A1 – $p = 0,00$; A2 – $p = 0,00$). A variação absoluta da altura máxima atingida ($\Delta = \text{Salto Pós} - \text{Salto Pré}$) não sofreu alteração significativa (Figura 9).

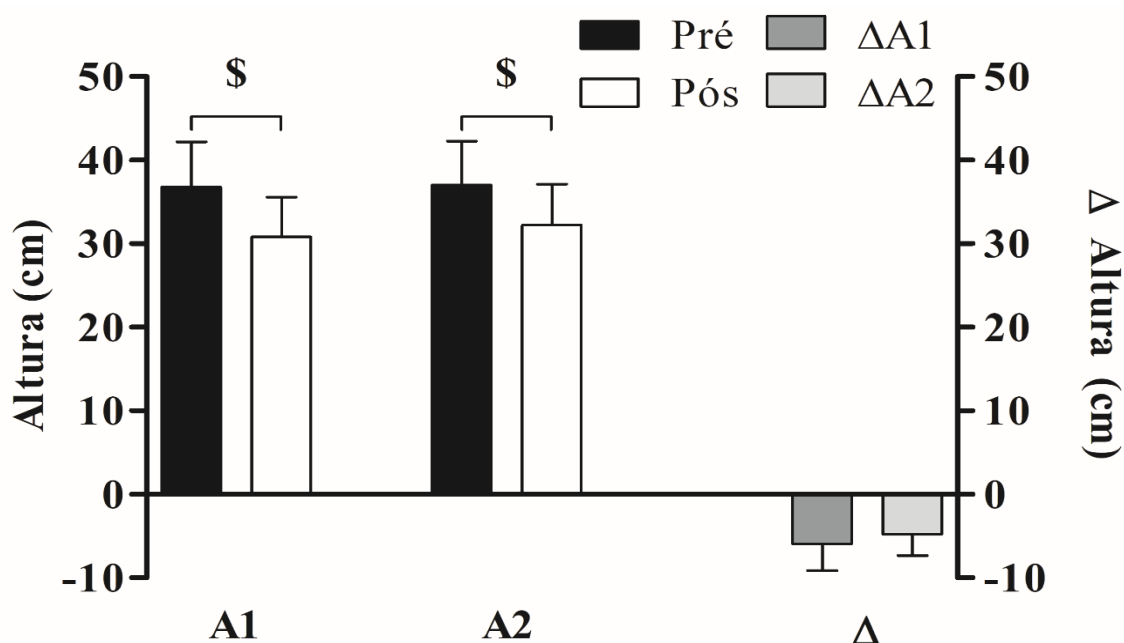


Figura 9. Efeito da FASE 1 na *performance* dos saltos verticais Pré e Pós RSA. \$Pós < Pré.

As avaliações neuromusculares não revelaram alterações significativas entre A1 e A2 em nenhuma condição (Pré vs. Pós) ($F_{[1,36]} < 1,31 - p > 0,25$). Houve diminuição significativa para todas as variáveis provenientes do sinal de força quando comparado Pré vs. Pós RSA em ambos os momentos ($F_{[1,36]} > 17,11 - p < 0,00$). Quanto às variáveis EMG, nenhuma delas apresentou alteração significativa quando comparadas as condições Pré vs. Pós RSA em A1 e A2 ($F_{[1,36]} < 3,27 - p > 0,07$). As variações absolutas também não foram significativamente alteradas ($p > 0,06$) (Tabela 3).

Tabela 3. Média \pm DP da avaliação neuromuscular Pré vs. Pós RSA, A1 vs. A2.

	A1				A2			
	Pré	Pós	P (<i>post hoc</i>)	Δ	Pré	Pós	P (<i>post hoc</i>)	Δ
Força								
F_{pico}	644,6 \pm	571,0 \pm	0,00	-73,6 \pm	609,2 \pm	555,3 \pm	0,00	-53,9 \pm
(N)	81,2	100,7 ^s		76,8	82,8	83,6 ^s		53,3
T_{HF}	269,9 \pm	261,0 \pm	0,02	-8,9 \pm	274,9 \pm	262,4 \pm	0,00	-12,5 \pm
(N)	33,9	31,8 ^s		15,5	35,9	33,9 ^s		16,3
T_{LF}	238,8 \pm	178,0 \pm	0,00	-60,9 \pm	244,1 \pm	188,6 \pm	0,00	-55,4 \pm
(N)	41,1	34,6 ^s		29,6	47,0	41,1 ^s		30,7
AV	91,7 \pm	86,9 \pm	0,00	-4,8 \pm	87,9 \pm	83,4 \pm	0,00	-4,5 \pm
(%)	5,7	6,7 ^s		5,4	7,9	10,5 ^s		5,2
EMG								
RMS_VL	259,1 \pm	255,5 \pm	0,79	-3,6 \pm	285,5 \pm	270,5 \pm	0,28	-15,0 \pm
(μ V)	81,0	64,1		59,3	59,7	59,2		60,3
RMS_BF	49,8 \pm	41,4 \pm	0,28	-8,4 \pm	45,4 \pm	34,1 \pm	0,15	-11,3 \pm
(μ V)	41,3	31,4		37,3	34,0	12,6		29,4
M-Wave	6,1 \pm	6,3 \pm	0,62	0,2 \pm	6,7 \pm	6,4 \pm	0,27	-0,4 \pm
(mV)	1,8	1,7		1,3	2,0	1,7		1,7
RMS/MW	0,045 \pm	0,043 \pm	0,85	-0,001 \pm	0,047 \pm	0,045 \pm	0,36	-0,002 \pm
(U.A.)	0,016	0,015		0,011	0,019	0,015		0,014

^sPós < Pré.

T_{LIM}: Não foram verificadas diferenças significativas para Capacidade Anaeróbia ($p = 0,13$), contribuição do metabolismo glicolítico ($p = 0,42$) e contribuição do metabolismo dos fosfagênios ($p = 0,24$), entretanto o Tempo Limite apresentou queda significativa ($p = 0,01$). A análise da magnitude do efeito apontou as inferências *Provavelmente positivo* para o Capacidade Anaeróbia, *Não claro* para a contribuição do metabolismo glicolítico, *Possivelmente positivo* para contribuição do metabolismo dos fosfagênios e *Muito provavelmente negativo* para o Tempo Limite (Figura 10).

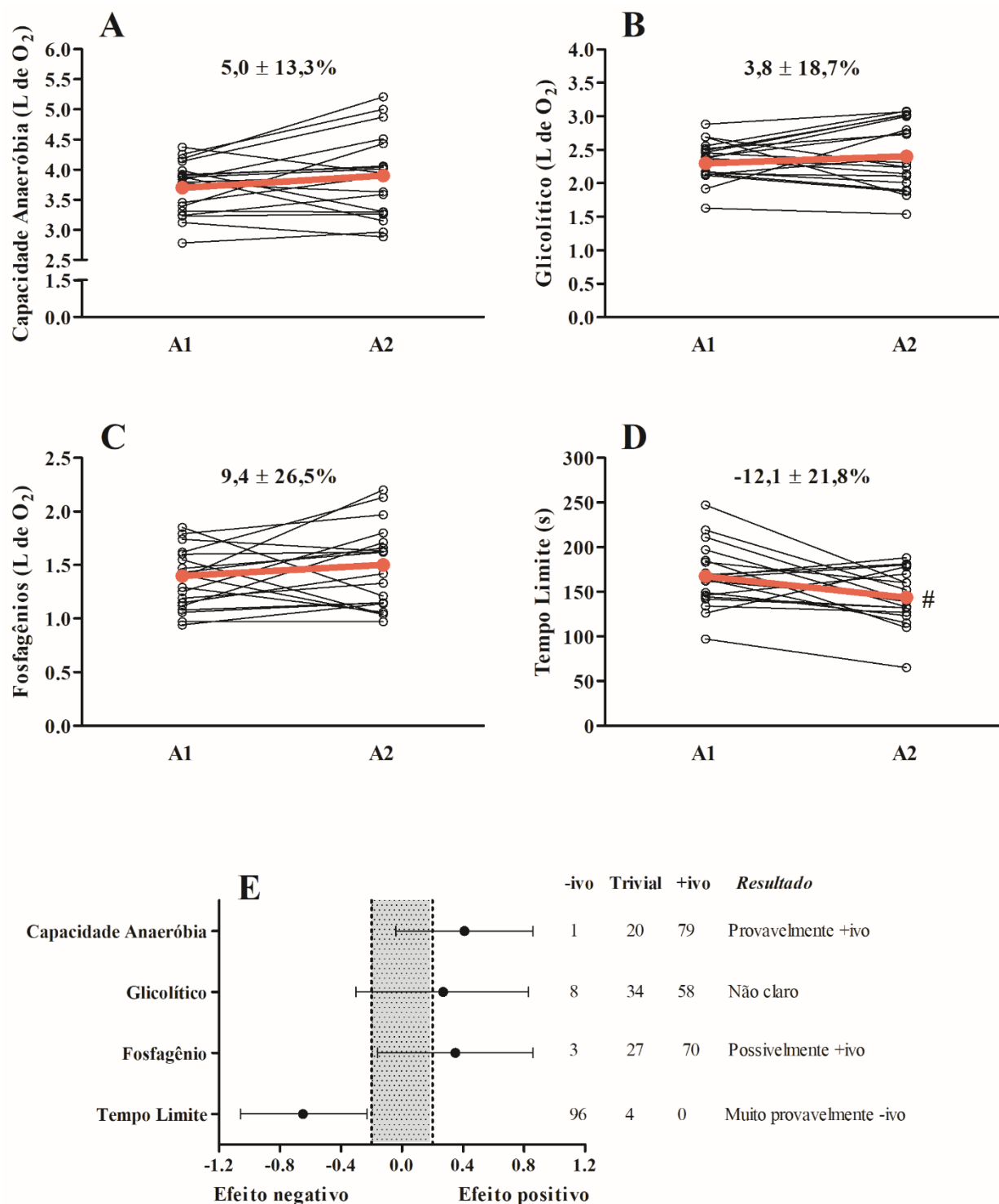


Figura 10. Efeito da FASE 1 nas variáveis do T_{LIM} (linha vermelha representa a adaptação média e número no topo reporta alteração percentual entre A1 e A2). **A** – Máximo déficit de oxigênio acumulado. **B** – Contribuição do metabolismo glicolítico. **C** – Contribuição do metabolismo dos fosfagênios. **D** – Tempo limite até exaustão. **E** – Análise baseada na magnitude do efeito. #A2 < A1.

6.2. FASE 2 (G β : n = 10; GP: n = 9)

A partir desse momento, os 19 participantes foram randomizados em dois grupos (G β n = 10; GP n = 9). Ainda, por livre-arbítrio, dois participantes se recusaram a realizar a segunda biópsia muscular (A2), dessa forma, as análises biomoleculares referem-se a 17 participantes (G β n = 9; GP n = 8).

Consumo proteico: Não houve diferença significativa no consumo de proteína entre os grupos (G β : $118,2 \pm 33,7$ g; GP: $110,1 \pm 34,3$ g – p = 0,61).

Conteúdo de carnosina intramuscular (G β : n = 9; GP: n = 8): O G β apresentou aumento significativo do conteúdo de carnosina intramuscular após as 6 semanas de intervenção, resultado que não foi acompanhado pelo GP ($F_{[1, 15]} = 12,3$ – p = 0,01; *post hoc*: G β = 0,001; GP = 0,54). Ainda, foi verificada interação significativa entre os grupos no momento A3, com maiores valores do conteúdo de carnosina intramuscular para o G β ($F_{[1, 15]} = 19,9$ – p = 0,01; *post hoc*: A2 = 0,72; A3 = 0,01) (Figura 11).

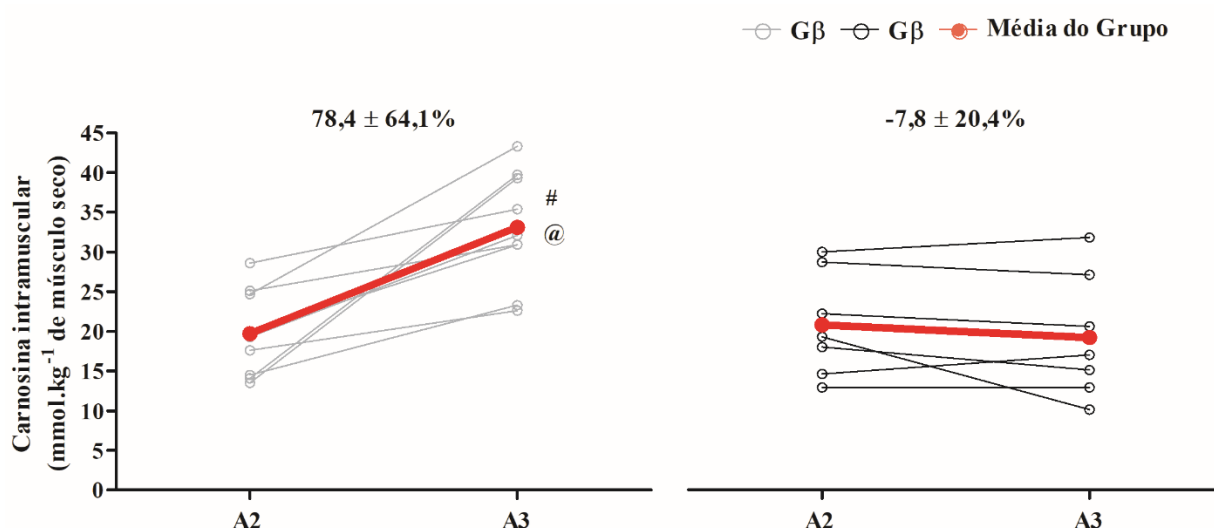


Figura 11. Conteúdo intramuscular de carnosina para G β e GP em A2 e A3. #A3 > A2. @G β > GP.

Capacidade de tamponamento muscular *in vitro* (G β : n = 9; GP: n = 8): A capacidade de tamponamento muscular *in vitro* ($\beta_{m_{in vitro}}$) não foi alterada significativamente entre os momentos ($F_{[1, 15]} = 3,0 - p = 0,10$) ou apresentou interação significativa entre os grupos ($F_{[1, 15]} = 0,66 - p = 0,43$) (Figura 12).

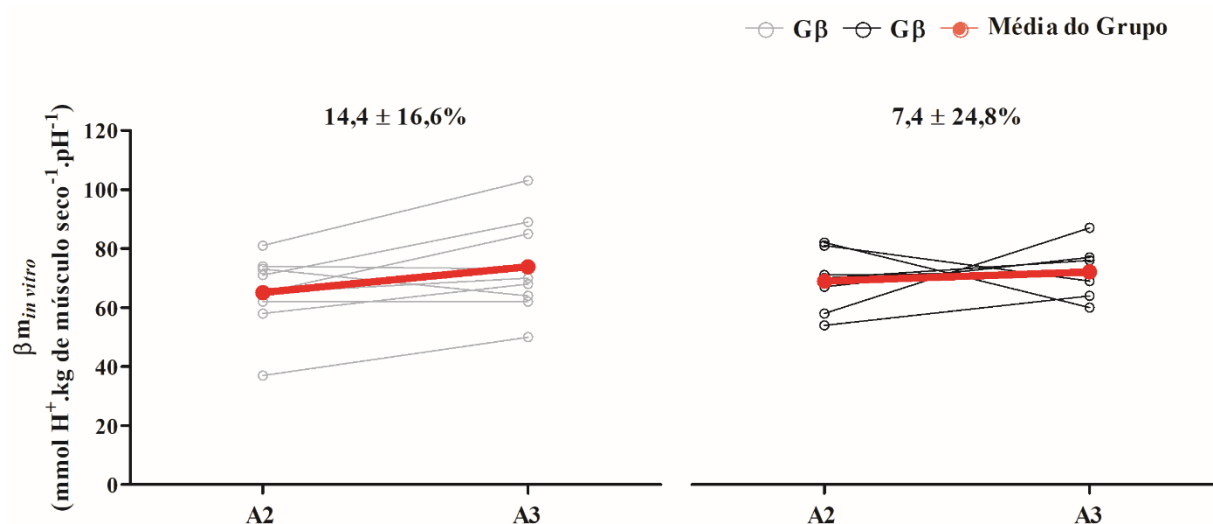


Figura 12. Capacidade de tamponamento muscular *in vitro* para G β e GP em A2 e A3.

Composição corporal: As variáveis de composição corporal não foram alteradas significativamente em ambos os grupos (G β vs. GP) ($F_{[1, 17]} < 5,28 - p > 0,06$), em nenhum momento (A2 vs. A3) ($F_{[1, 17]} < 1,43 - p > 0,25$). Da mesma maneira a variação absoluta ($\Delta = A3 - A2$) de cada grupo não apresentou alteração estatisticamente significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Média \pm DP da composição corporal G β vs. GP, A2 vs. A3.

	G β				GP			
	A2	A3	P (post hoc)	Δ	A2	A3	P (post hoc)	Δ
PC (kg)	74,2 \pm 10,2	74,2 \pm 10,4	0,85	-0,1 \pm 1,7	73,8 \pm 4,3	72,9 \pm 4,3	0,09	-0,9 \pm 1,2
%Gord (%)	17,7 \pm 2,6	16,6 \pm 4,0	0,10	-1,1 \pm 1,9	18,3 \pm 5,3	17,4 \pm 4,7	0,19	-0,9 \pm 2,1
MM (kg)	57,1 \pm 8,0	57,7 \pm 8,4	0,19	0,6 \pm 1,3	56,2 \pm 4,5	56,1 \pm 4,7	0,82	-0,1 \pm 1,6
MG (kg)	12,9 \pm 2,6	12,0 \pm 3,5	0,13	-0,8 \pm 1,5	13,3 \pm 4,1	12,4 \pm 3,5	0,12	-0,9 \pm 1,7

T_{INC} : Nenhuma das variáveis relativas ao T_{INC} apresentaram interações significativas entre grupos ($F_{[1, 17]} < 3,39 - p = 0,08$), entretanto ambos os grupos apresentaram aumento significativo após a intervenção tanto do $\dot{V}O_{2max}$ relativo ($F_{[1, 17]} = 60,6 - p = 0,00$; *post hoc*: $G\beta - p = 0,00$; $GP - p = 0,00$) quanto do $\dot{V}O_{2max}$ absoluto ($F_{[1, 17]} = 27,7 - p = 0,00$; *post hoc*: $G\beta - p = 0,00$; $GP - p = 0,01$). A V_{max} também foi significativamente alterada após a FASE 2 em ambos os grupos ($F_{[1, 17]} = 47,4 - p = 0,00$; *post hoc*: $G\beta - p = 0,00$; $GP - p = 0,01$), entretanto a $[La]_{pico}$ apresentou maiores valores somente para $G\beta$ após a FASE 2 ($F_{[1, 17]} = 17,0 - p = 0,00$; *post hoc*: $G\beta - p = 0,00$; $GP - p = 0,13$) (Figura 13).

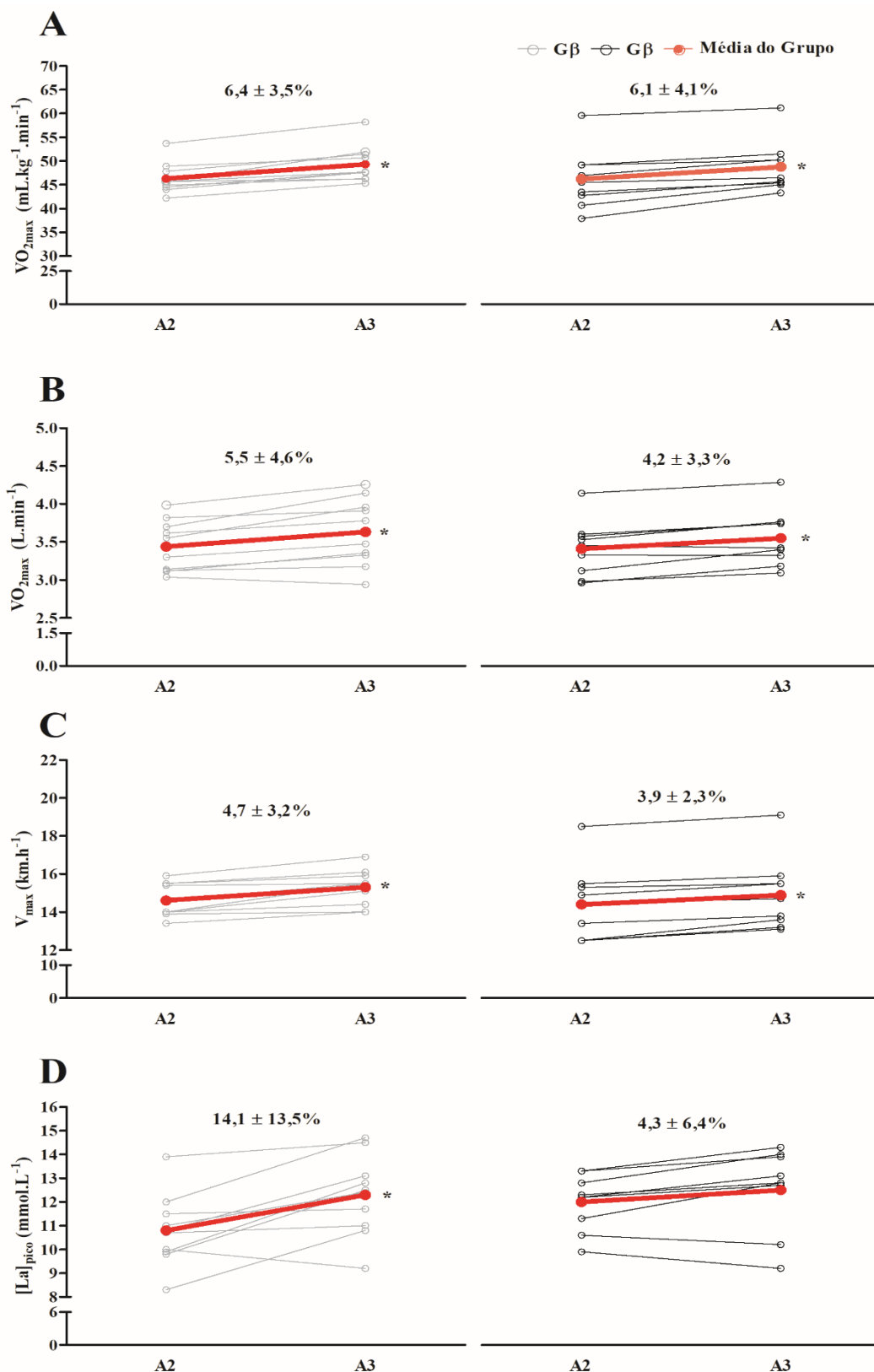


Figura 13. Efeito da FASE 2 nas variáveis do T_{INC} (linha vermelha representa a adaptação média e número no topo reporta alteração percentual entre A2 e A3). **A** – $\dot{V}O_{2max}$ relativo. **B** – $\dot{V}O_{2max}$ absoluto. **C** – Velocidade máxima atingida no T_{INC}. **D** – Concentração pico de lactato sanguíneo. *A3 > A2.

A análise baseada na magnitude do efeito entre os grupos revelou inferências *Provavelmente trivial* para as variáveis $\dot{V}O_{2max}$ ($mL.kg^{-1}.min^{-1}$) e V_{max} , por outro lado o $\dot{V}O_{2max}$ ($L.min^{-1}$) e a $[La]_{pico}$ apresentaram inferências favoráveis ao $G\beta$ em comparação com GP após a intervenção (Figura 14).

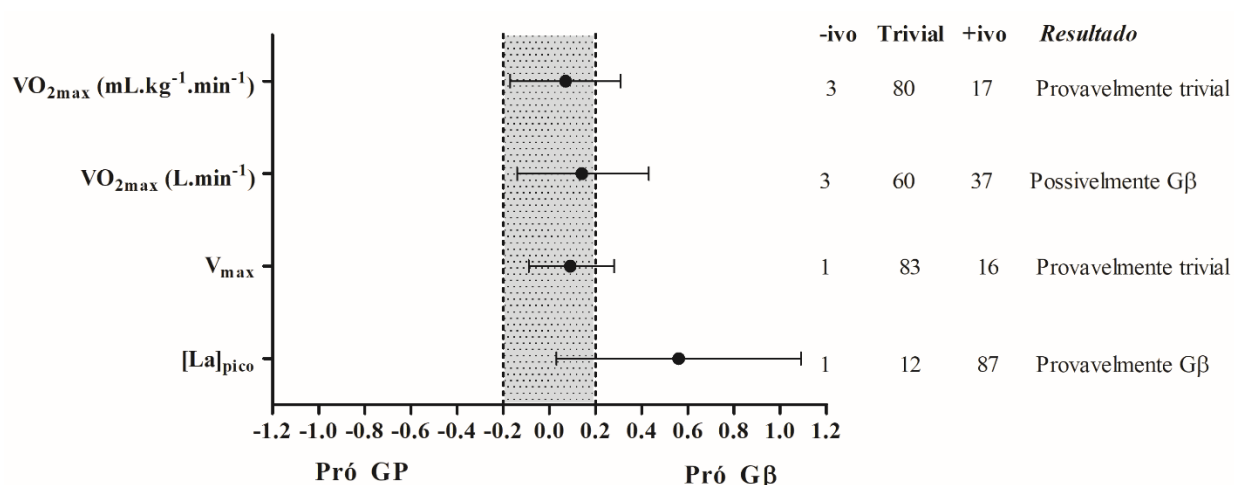


Figura 14. Análise baseada na magnitude do efeito das variáveis provenientes do T_{INC} .

Em relação à *performance* nos saltos verticais, não houve interação significativa entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 0,83 - p = 0,49$). Ambos grupos apresentaram queda significativa dos saltos Pós T_{INC} em A3 comparado com os saltos Pré T_{INC} em A3 ($F_{[1, 17]} < 7,15 - p > 0,00$). Adicionalmente, o GP apresentou aumento significativo dos saltos realizados em repouso. Quando comparada as variações absolutas de cada grupo ($\Delta = \text{Salto Pós} - \text{Salto Pré}$), não houve interação entre os grupos ($F_{[1,17]} = 0,08 - p = 0,78$) e somente o delta do momento A3 do GP foi significativamente maior quando compara com o delta do momento A2 ($F_{[1,17]} = 8,46 - p = 0,01$), (Figura 15).

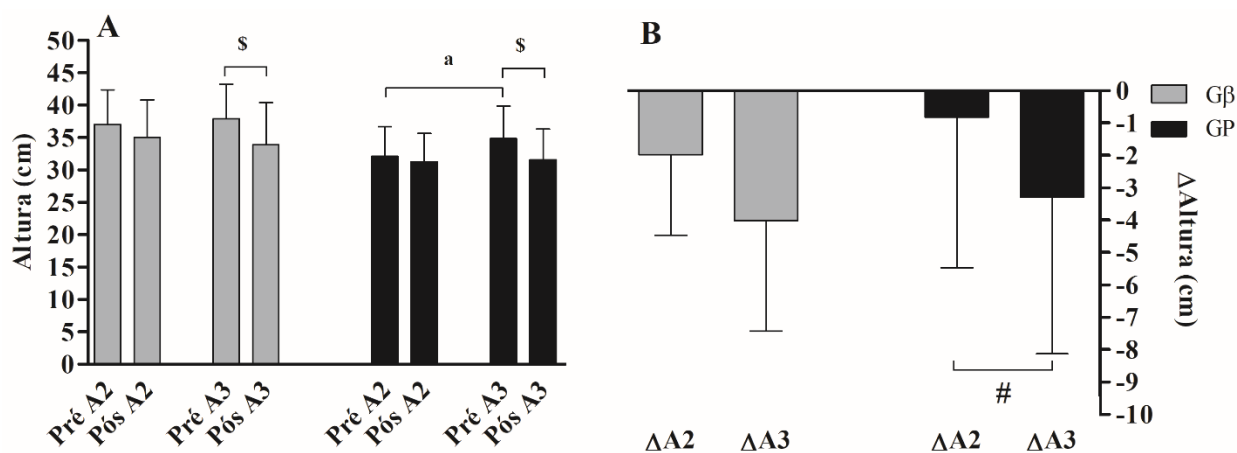


Figura 15. **A** – Efeito da FASE 2 na *performance* dos saltos verticais Pré e Pós T_{INC}. **B** – Alteração absoluta ($\Delta = \text{Pós} - \text{Pré}$) na *performance* dos saltos verticais Pré e Pós T_{INC}. \$Pós < Pré. ^aPré A3 > Pré A2. #A3 < A2.

Em relação à análise neuromuscular do sinal de força Pré vs. Pós T_{INC} em A2 e A3, não foram verificadas interações significativas entre os grupos para nenhuma variável ($F_{[1, 17]} < 1,18 - p > 0,33$). O GP não apresentou valores de F_{pico} significativamente diferentes; já o Gβ apresentou diminuição da F_{pico} em A2 e diminuição da F_{pico} em repouso em A3 comparada com A2 ($F_{[1, 17]} = 7,26 - p = 0,00$). As variações absolutas também não apresentaram interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 0,17 - p = 0,68$), tampouco foram estatisticamente alteradas dentro dos grupos ($F_{[1, 17]} = 0,23 - p = 0,64$).

A T_{HF} não apresentou alteração significativa no GP. O Gβ apresentou diminuição dos valores de T_{HF} em repouso e em estado fadigado quando comparado A2 e A3 ($F_{[1, 17]} = 7,49 - p = 0,02$). As variações absolutas não apresentaram interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 0,02 - p = 0,88$) e não foram estatisticamente alteradas dentro dos grupos ($F_{[1, 17]} = 0,01 - p = 0,98$).

A T_{LF} apresentou alterações idênticas para ambos os grupos, com diminuição Pós T_{INC} em A2 e A3 ($F_{[1, 17]} = 64,49 - p = 0,00$). As variações absolutas não apresentaram interação entre grupos ($F_{[1, 17]} = 1,10 - p = 0,31$) assim como não foram estatisticamente alteradas ($F_{[1, 17]} = 3,18 - p = 0,09$).

A AV apresentou diminuição significativa Pós T_{INC} em A2 e A3 para ambos os grupos. Ainda, GP apresentou diminuição da AV em estado fadigado em A3 comparado com A2 ($F_{[1, 17]} = 15,48 - p = 0,00$). As variações absolutas não apresentaram interações significativas entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 0,88 - p = 0,36$) e também não foram estatisticamente alteradas ($F_{[1, 17]} = 1,84 - p = 0,19$) (Figura 16).

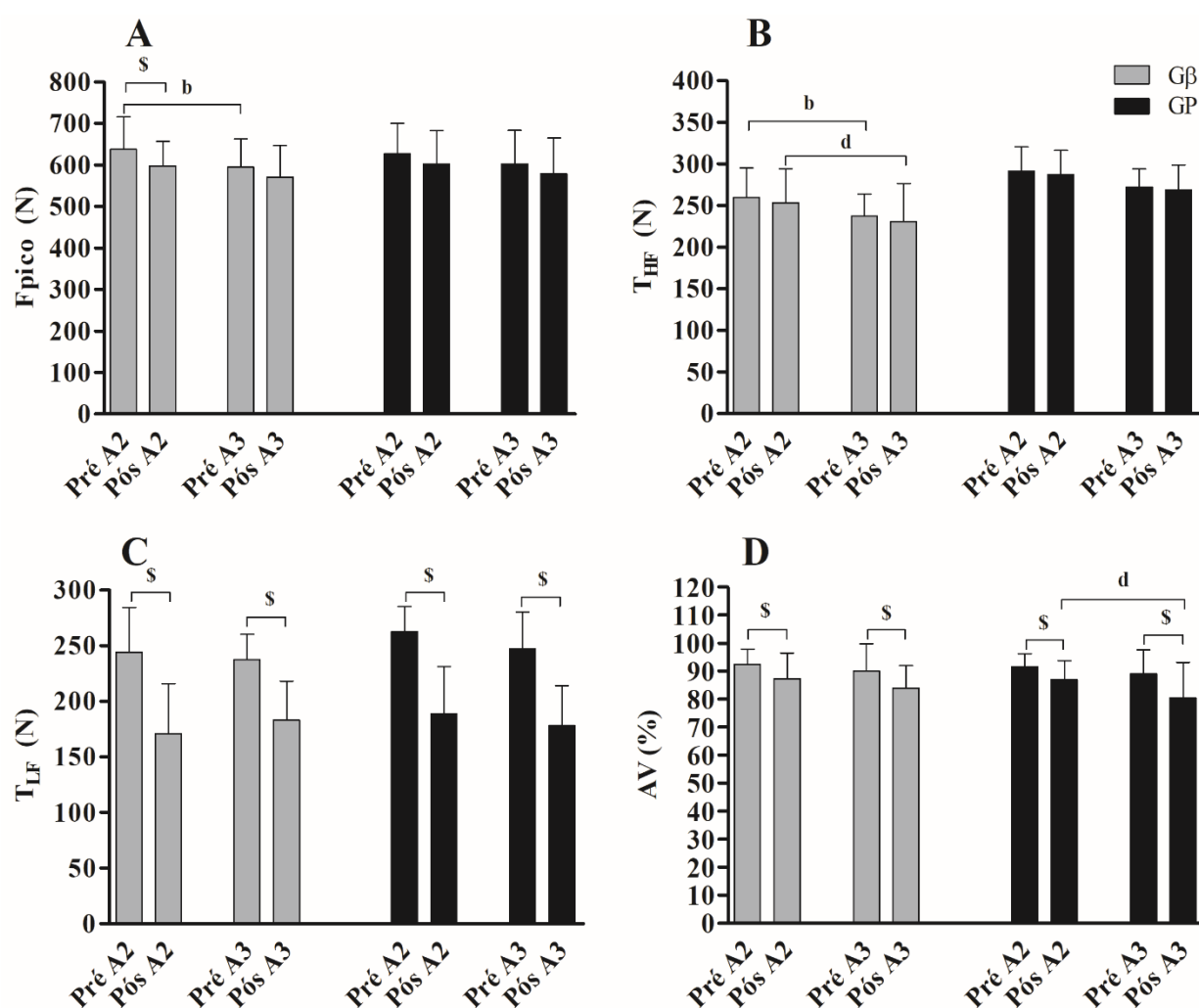


Figura 16. Efeitos da FASE 2 nas variáveis neuromusculares provenientes do sinal de força nas condições Pré e Pós T_{INC} em A2 e A3. **A** – Força pico. **B** – *Twitch* de alta frequência. **C** – *Twitch* de baixa frequência. **D** – Ativação voluntária. ^sPós < Pré. ^bPré A3 < Pré A2. ^dPós A3 < Pós A2. ^fPós A3 < Pré A3 – $p < 0,01$.

Em relação às variáveis provenientes do sinal EMG, o RMS_VL ($F_{[1, 17]} = 1,63 - p = 0,19$) e o RMS_BF ($F_{[1, 17]} = 0,98 - p = 0,36$), não apresentaram alterações significativas, assim como interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} < 1,44 - p > 0,61$). Já a *M-Wave*, apesar de não ter apresentado interação entre grupos ($F_{[1, 17]} = 0,77 - p = 0,45$), tanto GP quanto Gβ apresentaram diminuição da *M-Wave* em estado fadigado em A3 comparado com A2 ($F_{[1, 17]} = 10,61 - p = 0,00$). As variações absolutas não foram estatisticamente alteradas ($F_{[1, 17]} = 1,53 - p = 0,23$), tampouco foi verificada interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 0,86 - p = 0,37$).

Finalmente, a RMS/MW apresentou a mesma tendência da *M-Wave* e não apresentou interação entre grupos ($F_{[1, 17]} = 0,35 - p = 0,70$), contudo GP apresentou aumento da RMS/MW em estado fadigado em após a intervenção ($F_{[1, 17]} = 6,58 - p = 0,01$). As variações absolutas também não foram estatisticamente alteradas ($F_{[1, 17]} = 1,11 - p = 0,31$), tampouco foi verificada interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 0,23 - p = 0,64$) (Figura 17).

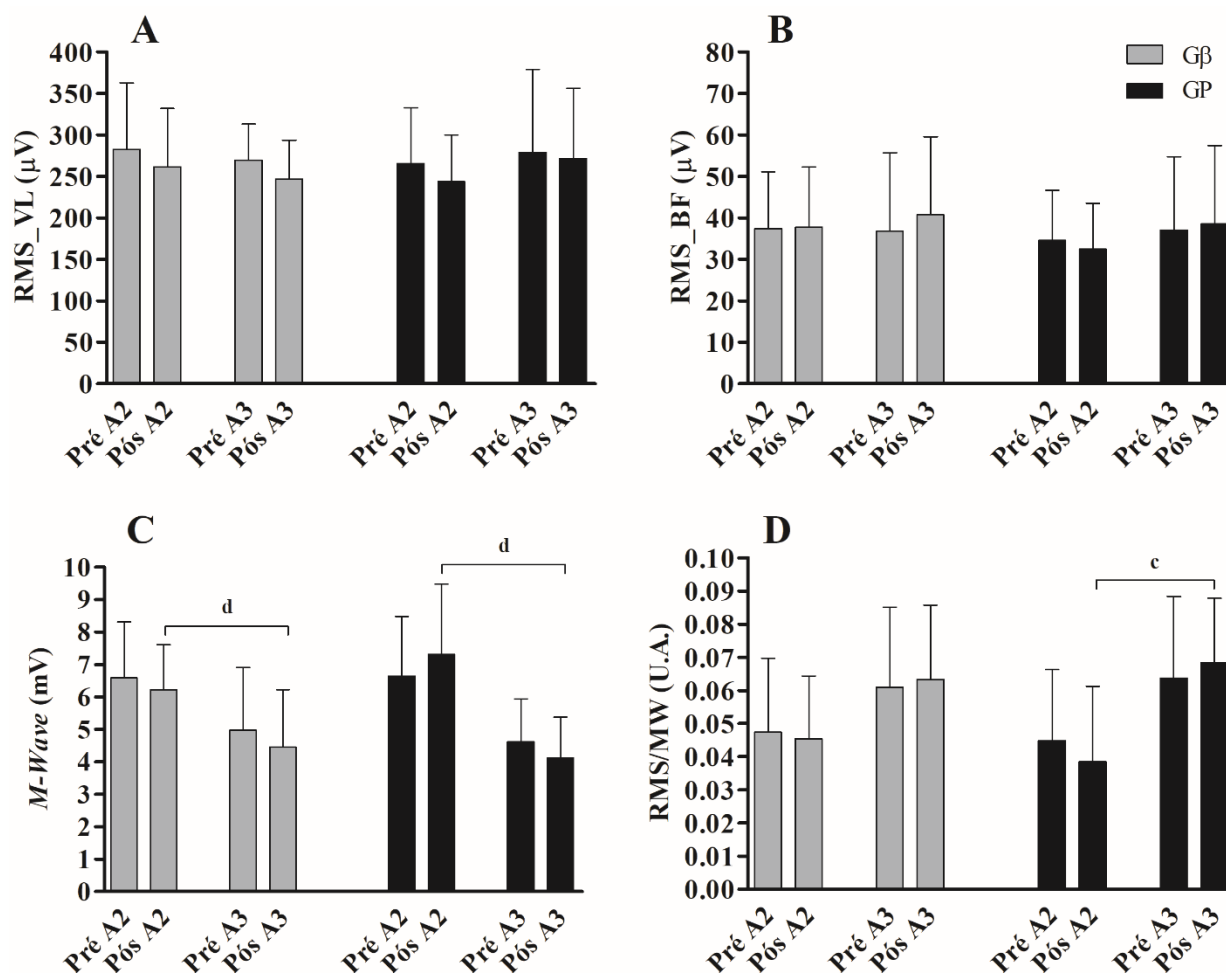


Figura 17. Efeitos da FASE 2 nas variáveis neuromusculares provenientes do sinal EMG nas condições Pré e Pós T_{INC} em A2 e A3. **A** – RMS do músculo vasto lateral. **B** – RMS do músculo bíceps femoral. **C** – *M-Wave*. **D** – Razão RMS/MW. ^cPós A3 > Pós A2. ^dPós A3 < Pós A2.

RSA: As variáveis provenientes do RSA não apresentaram interações significativas entre os grupos ($F_{[1, 17]} < 7,3 - p > 0,06$). O Tempo Total, Melhor Tempo e o Pior Tempo apresentaram diminuição significativa somente para o Gβ ($F_{[1, 17]} > 5,7 - p < 0,03$; *post hoc*: Gβ – $p < 0,01$; GP – $p > 0,07$) e Tempo Médio apresentou diminuição significativa para ambos os grupos ($F_{[1, 17]} = 29,4 - p = 0,00$; *post hoc*: Gβ – $p = 0,00$; GP – $p = 0,04$) (Figura 18).

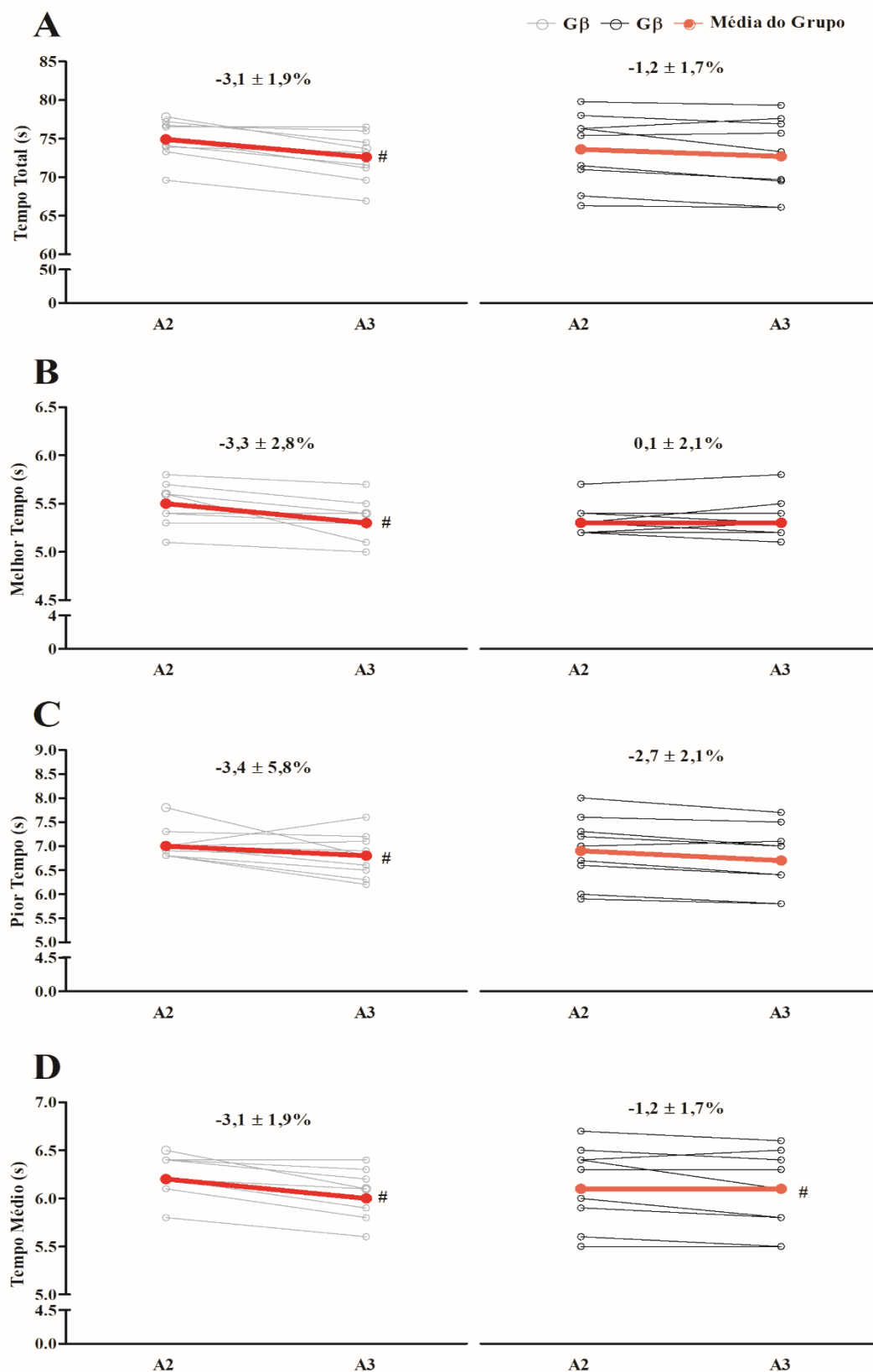


Figura 18. Efeitos da FASE 2 nas variáveis do RSA (linha vermelha representa a adaptação média e número no topo reporta alteração percentual entre A2 e A3). **A** – Tempo total. **B** – Melhor tempo. **C** – Pior Tempo. **D** – Tempo Médio. #A3 < A2. *A3 > A2.

O IF não apresentou mudança estatisticamente significativa ($F_{[1, 17]} = 0,92 - p = 0,35$). A $[La]_{\text{pico}}$ foi maior somente para o G β ($F_{[1, 17]} = 9,4 - p = 0,01$; *post hoc*: G $\beta - p = 0,01$; GP - $p = 0,49$) (Figura 19).

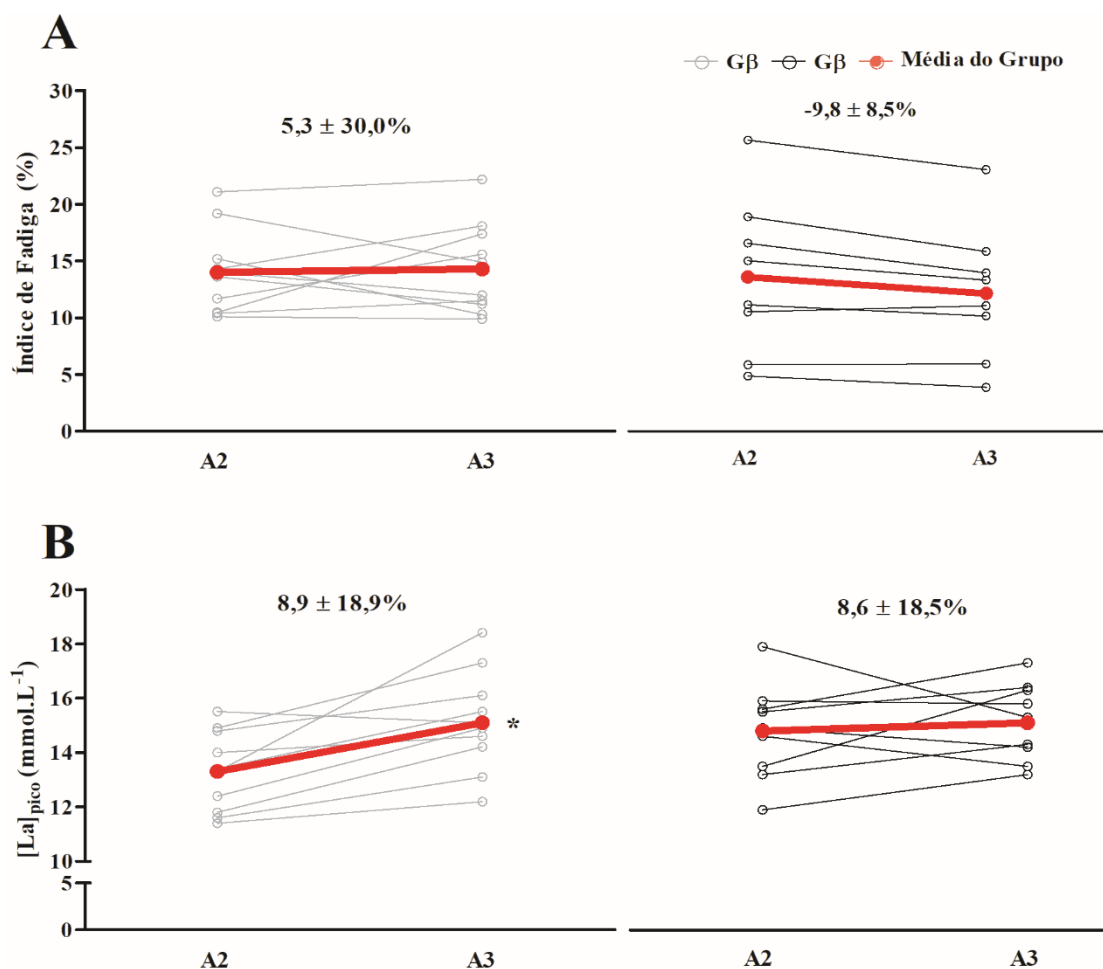


Figura 19. Efeitos da FASE 2 nas variáveis do RSA (linha vermelha representa a adaptação média e número no topo reporta alteração percentual entre A2 e A3). **A** – Índice de fadiga. **B** - Concentração pico de lactato sanguíneo. *A3 > A2.

A análise baseada na magnitude do efeito entre os grupos apontou que o Tempo Total, Melhor Tempo e Tempo Médio apresentaram resultados favoráveis para o G β após a intervenção, sendo que o Pior Tempo apresentou inferência *Não claro*. Por outro lado, o IF e a $[La]_{\text{pico}}$ apresentaram inferências favoráveis ao GP após o período de intervenção (Figura 20).

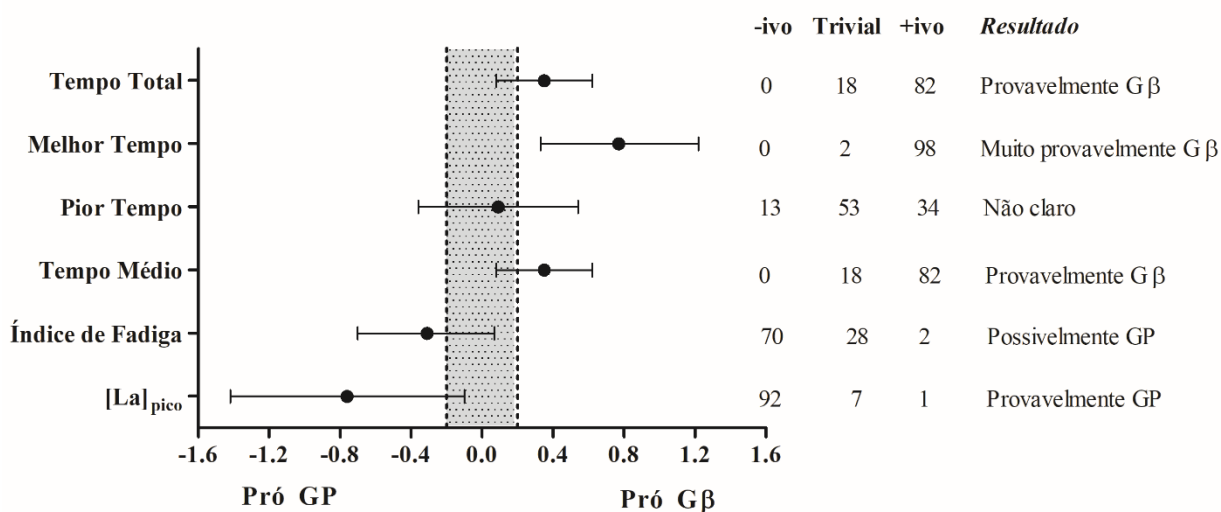


Figura 20. Análise baseada na magnitude do efeito das variáveis provenientes do RSA.

A investigação da *performance* dos saltos verticais antes e após o RSA não apresentou interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 1,51 - p = 0,22$). Ambos os grupos apresentaram diminuição da *performance* de salto nas condições Pós RSA em A2 e A3. Adicionalmente, o Gβ também apresentou aumento da altura do saltos realizados em repouso ($F_{[1, 17]} = 37,90 - p = 0,00$). As variações absolutas ($\Delta = \text{Salto Pós} - \text{Salto Pré}$) não foram diferentes estatisticamente ($F_{[1,17]} = 0,83 - p = 0,38$) e não houve interação entre os grupos ($F_{[1,17]} = 0,03 - p = 0,86$) (Figura 21).

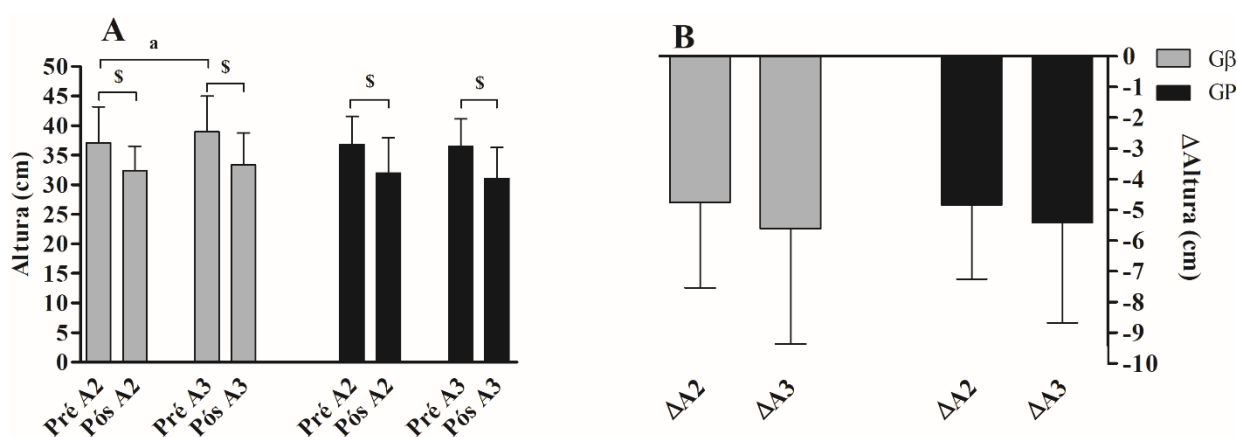


Figura 21. **A** – Efeito da FASE 2 na *performance* dos saltos verticais Pré e Pós RSA. **B** – Alteração absoluta ($\Delta = \text{Pós} - \text{Pré}$) na *performance* dos saltos verticais Pré e Pós RSA. ^cPós A2 < Pré A2 – $p < 0,00$. ^bPós A3 < Pré A3 – $p < 0,00$. ^aPré A3 > Pré A2 – $p = 0,00$.

Em relação à análise neuromuscular do sinal de força Pré vs. Pós RSA em A2 e A3, não foram verificadas interações significativas entre os grupos para a variável F_{pico} ($F_{[1, 17]} = 0,72 - p = 0,55$). A F_{pico} do GP apresentou diminuição significativa Pós RSA em ambos os momentos, enquanto o G β apresentou diminuição da F_{pico} Pós RSA somente em A2 ($F_{[1, 17]} = 9,71 - p = 0,00$). As variações absolutas em A2 e A3 de ambos os grupos não foram diferente estatisticamente ($F_{[1, 17]} = 0,80 - p = 0,39$), assim como não houve interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 0,31 - p = 0,58$).

A T_{HF} não apresentou interações significativas entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 1,13 - p = 0,33$). Novamente o GP apresentou diminuição significativa Pós RSA em ambos os momentos além de diminuição significativa da T_{HF} em estado fadigado enquanto que o G β não apresentou alterações significativas ($F_{[1, 17]} = 7,26 - p = 0,01$). As variações absolutas em A2 e A3 de ambos os grupos não foram diferente estatisticamente ($F_{[1, 17]} = 1,67 - p = 0,21$), assim como não houve interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 0,81 - p = 0,38$).

Não foram verificadas interações significativas entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 1,14 - p = 0,33$) para a variável T_{LF} , somente diminuição significativa Pós RSA para ambos os grupos em ambos os momentos ($F_{[1, 17]} = 23,96 - p = 0,00$). As variações absolutas em A2 e A3 de ambos os grupos não foram diferente estatisticamente ($F_{[1, 17]} = 0,84 - p = 0,78$) e não houve interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 2,74 - p = 0,12$).

Foi verificada diminuição significativa da AV em ambos os momentos para GP e somente em A2 para G β . Ainda, GP apresentou diminuição significativa da AV em estado fadigado após a intervenção enquanto houve aumento para o G β na mesma análise ($F_{[1, 17]} = 8,08 - p = 0,00$). A AV apresentou interação significativa entre os grupos, sendo a AV do G β em estado fadigado em A3 maior que a AV do GP para a mesma condição (Pós RSA) no mesmo momento (A3) ($F_{[1, 17]} = 4,8 - p = 0,01$; *post hoc*: Pré A2 = 0,86; Pós em A2 = 0,72; Pré A3 = 0,70; Pós em A3 = 0,04). Em relação as variações absolutas em A2 e A3, os grupos não foram diferente estatisticamente

($F_{[1, 17]} = 0,23 - p = 0,88$) e não foram verificadas interações entre os grupos ($F_{[1, 17]} = 5,55 - p = 0,06$). (Figura 22).

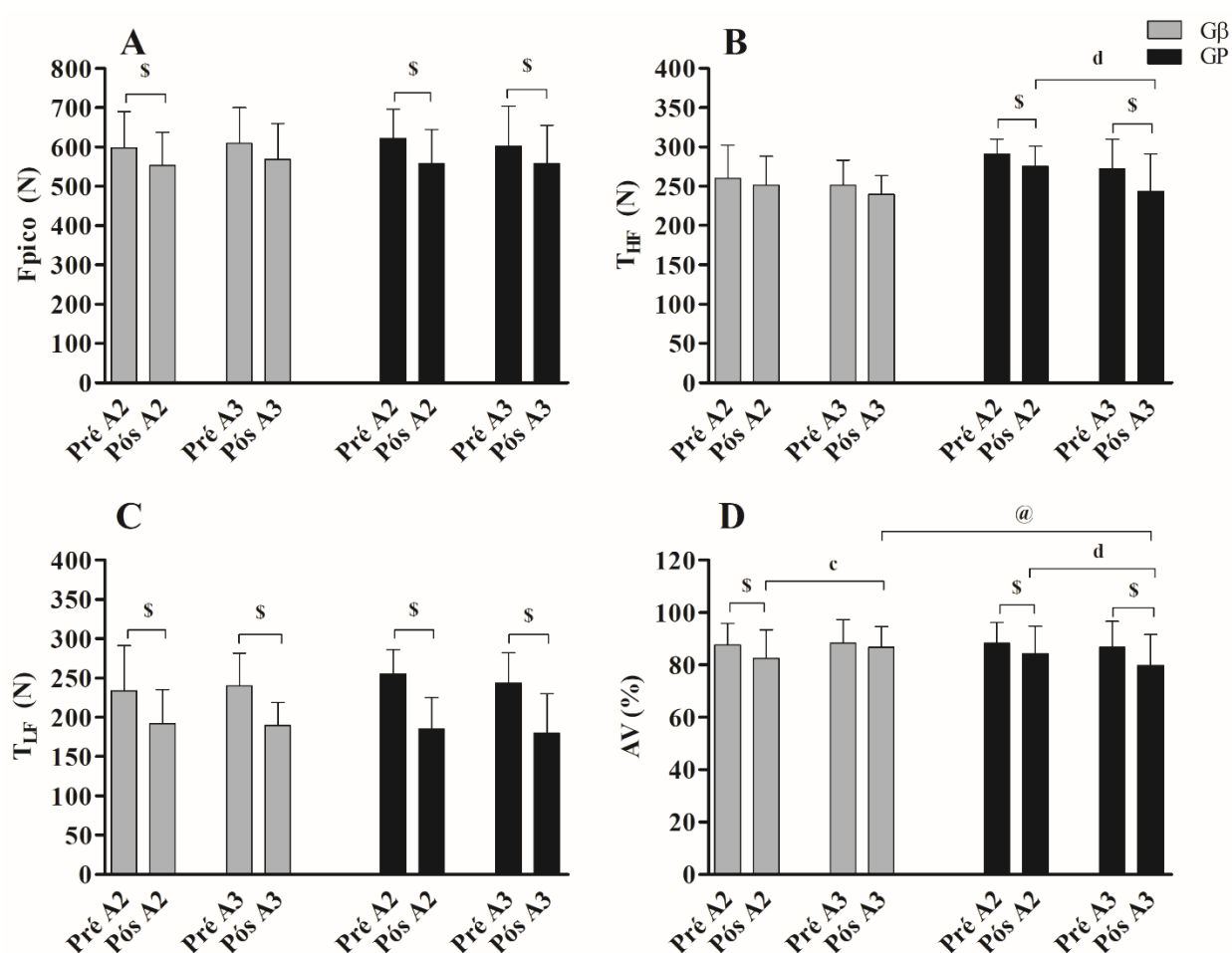


Figura 22. Efeitos da FASE 2 nas variáveis neuromusculares provenientes do sinal de força nas condições Pré e Pós RSA em A2 e A3. **A** – Força pico. **B** – *Twitch* de alta frequência. **C** – *Twitch* de baixa frequência. **D** – Ativação voluntária. ^sPós < Pré. ^dPós A3 < Pré A2. [@]Gβ > GP.

Ao contrário das variáveis provenientes do sinal de força, as variáveis provenientes do sinal EMG não apresentaram nenhuma alteração significativa entre as condições e momentos para ambos os grupos ($F_{[1, 17]} < 3,19 - p > 0,06$), bem como não houve interação entre os grupos ($F_{[1, 17]} < 0,63 - p > 0,55$). Da mesma maneira, não foram verificadas alterações significativas para as variações absolutas de ambos os grupos nos momentos A2 e A3 ($F_{[1, 17]} < 3,48 - p > 0,08$) e ainda não interação significativa entre os grupos ($F_{[1, 17]} < 1,88 - p > 0,19$) (Figura 23).

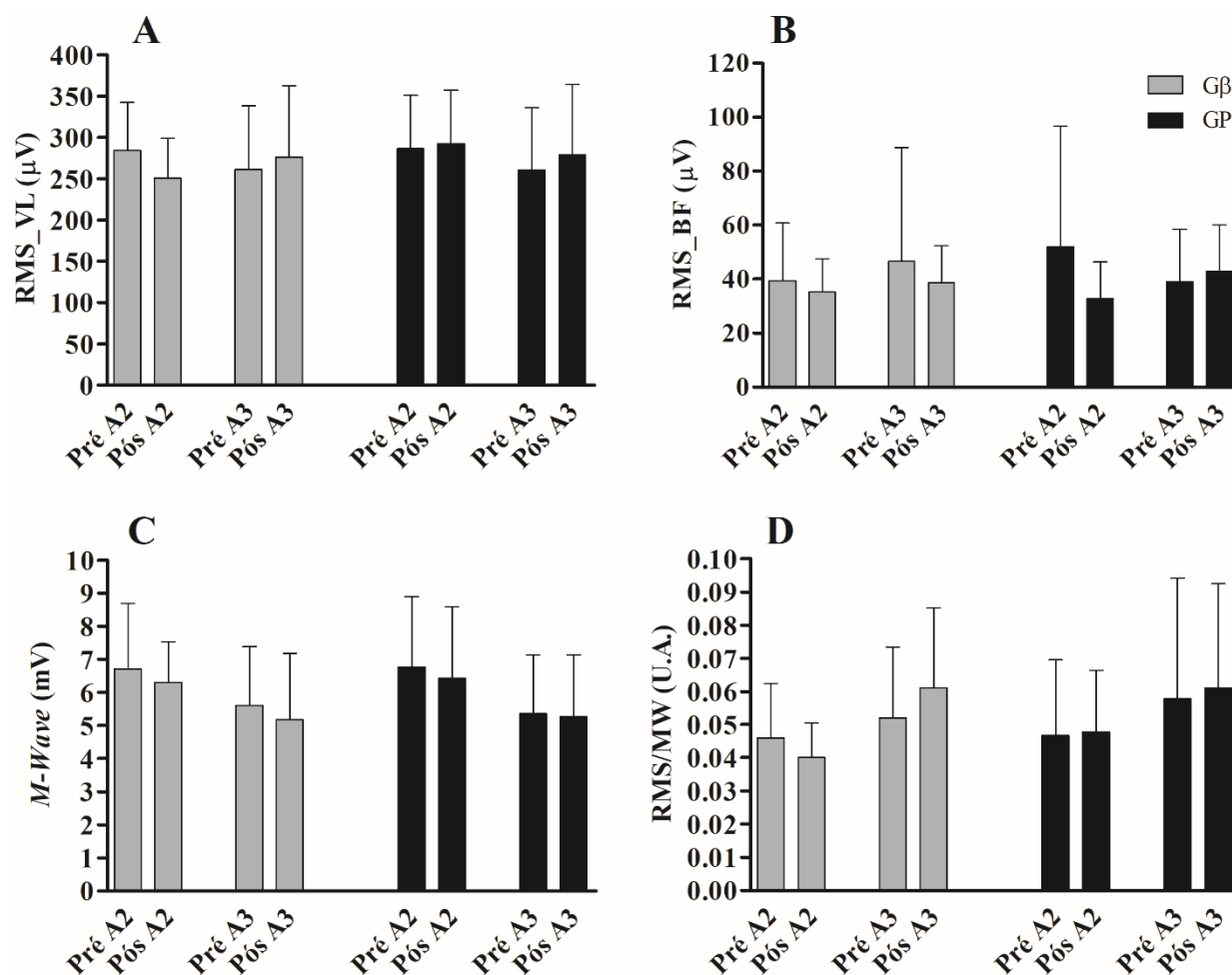


Figura 23. Efeitos da FASE 2 nas variáveis neuromusculares provenientes do sinal EMG nas condições Pré e Pós RSA em A2 e A3. **A** – RMS do músculo vasto lateral. **B** – RMS do músculo bíceps femoral. **C** – *M-Wave*. **D** – Razão RMS/MW.

T_{LIM} : Não houve interação significativa entre os grupos para nenhuma das variáveis analisadas no T_{LIM} ($F_{[1, 17]} < 0,72 - p > 0,41$). Capacidade Anaeróbia ($F_{[1, 17]} = 0,70 - p = 0,42$), contribuição do metabolismo glicolítico ($F_{[1, 17]} = 3,04 - p = 0,09$), contribuição do metabolismo dos fosfogênicos ($F_{[1, 17]} = 0,29 - p = 0,60$) e Tempo Limite ($F_{[1, 17]} = 1,3 - p = 0,28$) também não apresentaram alterações significativas entre momentos para nenhum grupo. (Figura 24).

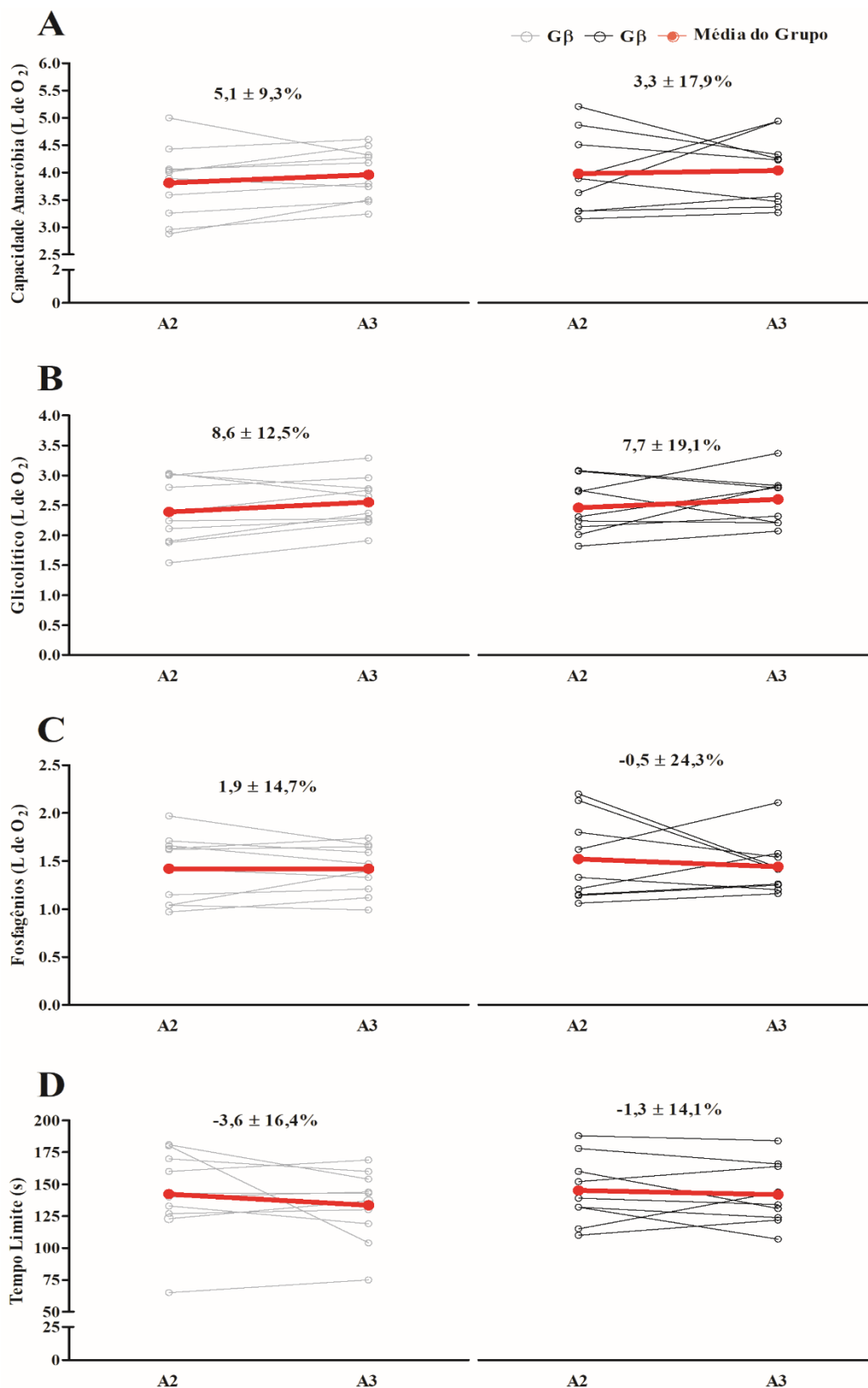


Figura 24. Efeitos da FASE 2 nas variáveis do T_{LIM} (linha vermelha representa a adaptação média e número no topo reporta alteração percentual entre A2 e A3). **A** – Máximo déficit de oxigênio acumulado. **B** – Contribuição do metabolismo glicolítico. **C** – Contribuição do metabolismo dos fosfagênios. **D** – Tempo limite até exaustão.

A análise da magnitude do efeito apontou inferências *Não claro* para todas as variáveis analisadas no T_{LIM} quando comparados $G\beta$ e GP (Figura 25).

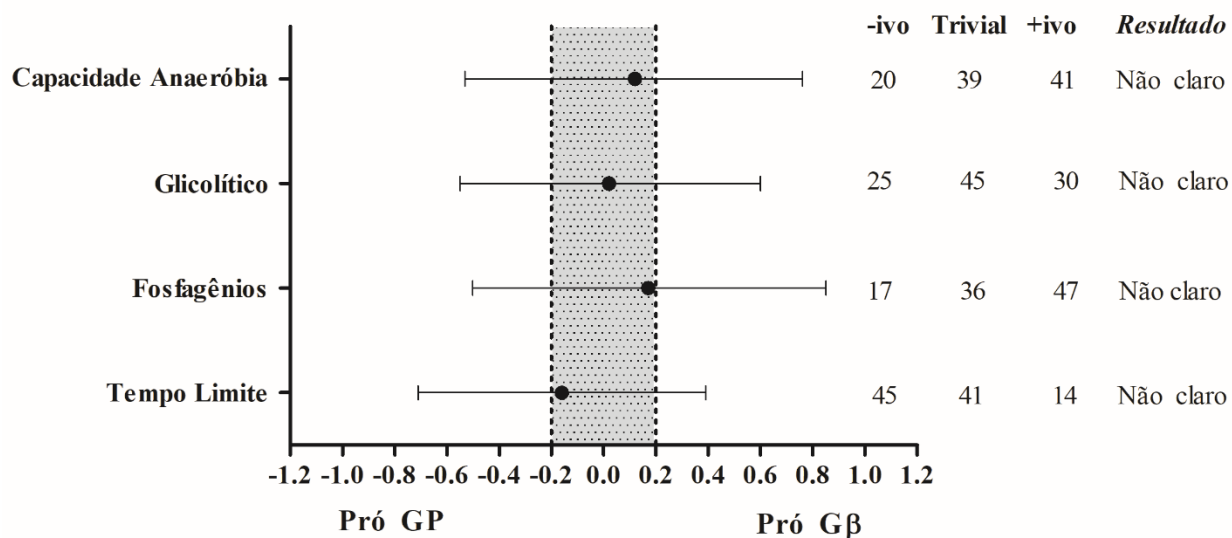


Figura 25. Análise baseada da magnitude do efeito das variáveis provenientes do T_{LIM} .

Conteúdo proteico/enzimático ($G\beta$: $n = 9$; GP: $n = 8$): Nenhuma das proteínas/enzimas investigadas apresentaram alteração do conteúdo citoplasmático após as seis semanas de intervenção ($F_{[1, 17]} < 2,79 - p > 0,12$) ou interação entre grupos ($F_{[1, 17]} < 4,16 - p > 0,06$) (Figura 26).

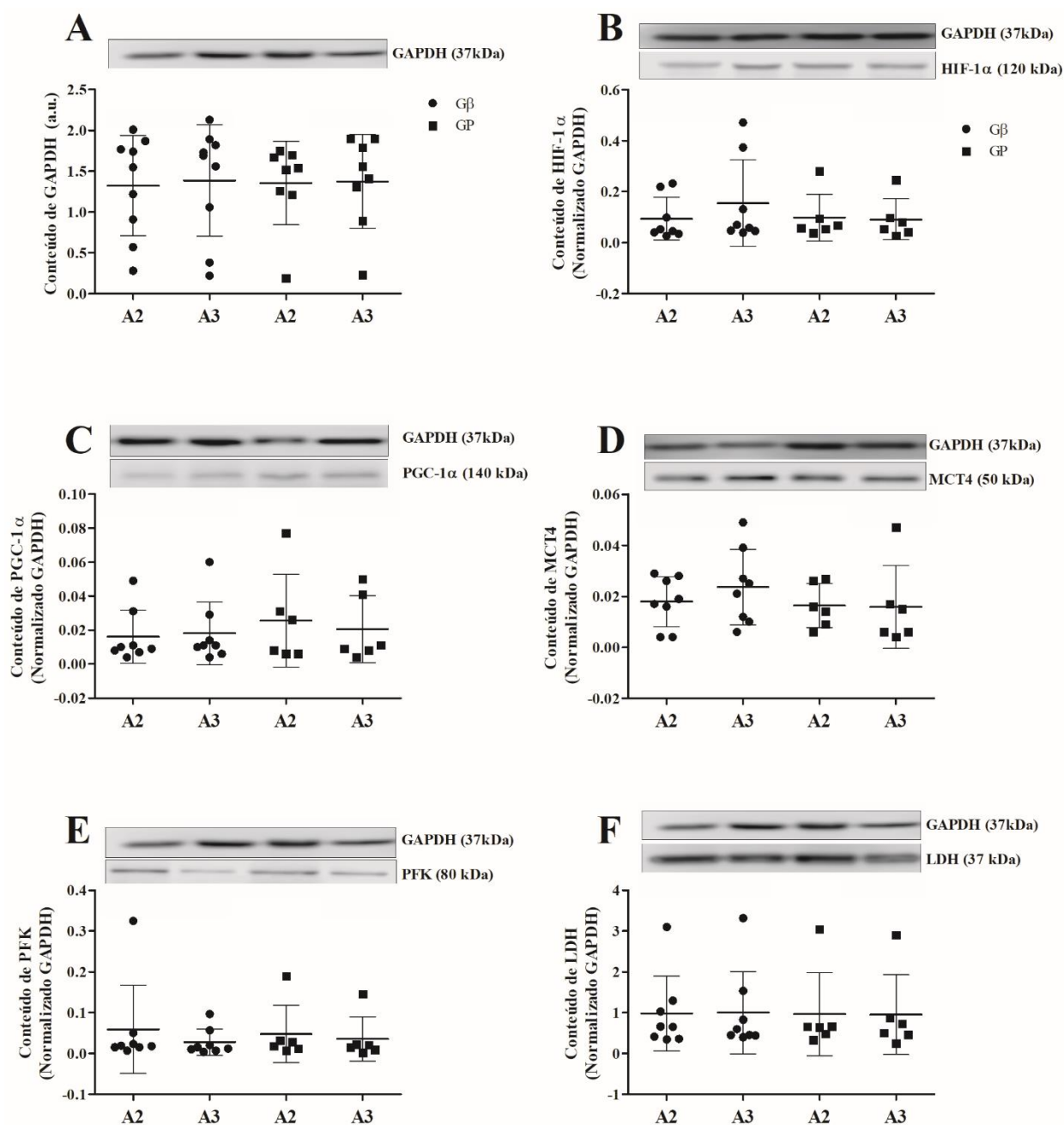


Figura 26. Conteúdo proteico/enzimático normalizado pela respectiva proteína padrão. **A** - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH – proteína padrão). **B** - Fator induzido por hipóxia 1 α (HIF-1 α). **C** - Co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α). **D** - Transportador monocarboxilado 4 (MCT4). **E** - Fosfofrutoquinase (PFK). **F** - Lactato desidrogenase (LDH). Géis representativos no topo da figura.

7. DISCUSSÃO

7.1. FASE 1

A discussão da FASE 1 será direcionada aos resultados obtidos a partir do programa de 4 semanas de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) proposto no presente projeto de pesquisa. A melhora de ~5% no $\dot{V}O_{2max}$, bem como o aumento significativo da V_{max} corroboram com vários estudos prévios que indicam que o HIIT é efetivo para induzir adaptações positivas nos sistemas cardiorrespiratório e oxidativo (GIBALA et al., 2012; LITTLE et al., 2010), pois permite que os indivíduos permaneçam um longo período na chamada zona vermelha; acima de 90% do $\dot{V}O_{2max}$ (BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a).

Em relação ao desempenho do RSA, apenas o Índice de Fadiga apresentou alterações significativas ao comparar A1 e A2. A análise baseada na magnitude do efeito apontou como inferências *Possivelmente positivo* para Tempo Total e *Possivelmente negativo* para Melhor Tempo. Dessa forma, embora o Melhor Tempo tenha aumentado, é possível assumir que, após a intervenção, a capacidade de manter o desempenho durante o RSA foi melhorada, uma vez que Tempo Total e especialmente o Índice de Fadiga diminuíram.

A melhora da capacidade oxidativa em A2 pode ser o principal fator para explicar esses resultados, já que o sistema oxidativo desempenha um papel importante na manutenção do desempenho durante *sprints* curtos (<10 s). De fato, Milioni et al. (2017b) encontraram um aumento significativo na contribuição do sistema oxidativo após o terceiro *sprint* durante série de 6 x 35 m com 10 s de recuperação passiva. McGawley e Bishop (2015) encontraram fortes correlações ($r = 0,81 - 0,93$, $p < 0,01$) entre a contribuição oxidativa durante o quinto, sexto e décimo *sprints* de 6 s e $\dot{V}O_{2max}$. Ainda, McGinley e Bishop (2016) encontraram melhora no decréscimo de trabalho durante *sprints* repetidos (5 x 6-s *sprints* all-out com 24 s de recuperação

passiva), mesmo sem aumento significativo concomitante no $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ após 4 semanas de HIIT (4 - 10 × 2 min a ~ 98% da potência de pico com recuperação passiva de 1 min).

Corroborando com os resultados, a análise baseada na magnitude do efeito para a $[\text{La}]_{\text{pico}}$ apontou inferência *Provavelmente negativo*, em A2 quando comparado com A1. Menores concentrações de lactato sanguíneo para realização de um mesmo esforço com características oxidativas após período de treinamento indicam adaptação do sistema aeróbio de fornecimento de energia e menor utilização do sistema glicolítico (CAMPOS et al., 2013).

As 4 semanas de HIIT induziram aumento na Capacidade Anaeróbia, com o aumento na contribuição do sistema dos fosfagênios sendo determinante para este resultado. Stöggl e Björklund (2017) encontraram, em atletas de endurance altamente treinados, um aumento significativo da concentração pico de lactato ($+7,3 \pm 4,7\%$, $p = 0,001$) durante um teste anaeróbio máximo de corrida/ciclismo após 9 semanas de HIIT composto por 4 × 4 min a 90 - 95% da FC_{max} com 3 min de recuperação a 75% da FC_{max} , no entanto, Bishop et al. (2008) administraram 5 semanas de HIIT (6 - 12 × 2 min a 100% $\dot{V}O_{2\text{max}}$) em mulheres saudáveis e verificaram decréscimo da concentração pico de lactato e aumento da capacidade de ressíntese de PCr após esforço (ciclismo) de 45 s a 190% do $\dot{V}O_{2\text{max}}$.

Os resultados do presente estudo podem estar ligados ao modelo de HIIT empregado. A recuperação passiva de 1 min pode permitir reabastecimento significativo de PCr muscular (GAITANOS et al., 1993) e, conseqüentemente, a prontidão desse sistema de energia para o esforço subsequente, o que pode induzir adaptação positiva do sistema de fosfogênio como verificado por Bishop et al. (2008); por outro lado, o intervalo de trabalho mais curto (1 min em vez de 4 min, como usado por Stöggl e Björklund (2017)) pode exigir menos do sistema glicolítico (BUCHHEIT; LAURSEN, 2013b).

Apesar da Capacidade Anaeróbia ter melhorado, o Tempo Limite diminuiu significativamente de A1 para A2. Este resultado é particularmente não resolvido na literatura. De forma semelhante aos nossos resultados, Graef et al. (2009) não encontraram diferença no trabalho total realizado (intensidade \times Tempo Limite) durante testes em intensidades fisiologicamente pareadas (110% de intensidade atingida ao $\dot{V}O_{2max}$) após 4 semanas de HIIT.

Apesar de ainda especulativo, hipotetiza-se que o HIIT, apesar de induzir melhora significativa no conteúdo de glicogênio intramuscular (GIBALA et al., 2012), no metabolismo oxidativo (LITTLE et al., 2010) e na capacidade anaeróbia (RAVIER et al., 2009), é possível que o conteúdo e a atividade de enzimas glicolíticas, como a fosfofrutoquinase (CHRISTENSEN et al., 2015) e a hexoquinase (WESTON et al., 1997), bem como o *turnover* anaeróbio de ATP (HARMER et al., 2000) permaneçam inalterados. Desta forma, a capacidade de acessar anaerobiamente os estoques energéticos aumentados durante esforço realizado em maior intensidade absoluta (apesar de ser fisiologicamente pareada) pode não ser adequadamente adaptada após o HIIT, resultando na queda do desempenho de Tempo Limite.

Alternativamente, em intensidades acima do máximo estado estável de lactato, especialmente em intensidades supramáximas, a taxa glicolítica e, conseqüentemente, a depleção de glicogênio são mais rápidas, como descrito por Beneke, Leithauser e Ochentel (2011) (para maiores informação verificar figura 5 da referência citada). Essa condição é ainda mais acentuada à medida que o indivíduo se torna mais treinado (BENEKE; LEITHAUSER; OCHENTEL, 2011), o que possivelmente contribui para o aumento acentuado do gasto energético durante esforços supramáximos realizados em maior intensidade absoluta após HIIT (mesmo a intensidade sendo fisiologicamente pareada), conseqüentemente diminuindo o Tempo Limite durante esforços supramáximos após o HIIT.

Devido à ausência de investigações sobre a etiologia da fadiga neuromuscular induzida por exercícios progressivos até a exaustão (ou seja, T_{INC}), a única comparação que pode ser feita é com exercícios retangulares submáximos até a exaustão. O'Leary et al. (2016) verificaram aumento do nível de fadiga periférica e atenuação do nível de fadiga central após o esforço retangular submáximo até a exaustão (~ 35 min) realizado após 6 semanas de HIIT (6-8 x 5 min a meio caminho entre o limiar anaeróbio e o $\dot{V}O_{2max}$, recuperação passiva de 1 min) em intensidades fisiologicamente pareadas (ou seja, a meio caminho entre o limiar anaeróbio e o consumo máximo de oxigênio medido no pré e pós treinamento). No entanto, quando o exercício foi realizado com a mesma intensidade absoluta que antes do treinamento, nenhum efeito foi verificado nas variáveis neuromusculares no momento da exaustão.

O presente estudo também encontrou aumento da fadiga periférica após o T_{INC} em A2 (maior variação absoluta na altura dos saltos verticais), mas sem atenuação na fadiga central. Esses resultados devem estar relacionados à melhora da capacidade dos participantes em manter o exercício, uma vez que o tempo de permanência no T_{INC} aumentou significativamente (A1: 621 ± 136 s; A2: 660 ± 111 s - $p = 0,001$ [$+7,7 \pm 8,8\%$]). É possível, portanto, que o treinamento sob fadiga periférica elevada, possa ter contribuído para a melhora da tolerância à fadiga periférica através de um aumento no limiar sensitivo da ação inibitória do grupo III/IV aferente, permitindo maior trabalho do músculo durante o exercício de *endurance*, como o T_{INC} .

De acordo com os resultados, o RSA induziu tanto fadiga central (diminuição da VA) como periférica (diminuição da T_{HF} e T_{LF}), corroborando com a literatura (BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a; FERNANDEZ-DEL-OLMO et al., 2013; TOMAZIN; MORIN; MILLET, 2017). Entretanto, o HIIT aparentemente não induziu a nenhum efeito protetivo contra a fadiga neuromuscular instaurada pelo RSA uma vez que esses resultados foram verificados em ambos os momentos.

Os resultados da FASE 1 confirmam a eficácia de um programa de HIIT (4 semanas) em variáveis do sistema oxidativo. Ainda, a Capacidade Anaeróbia foi melhorada devido ao aumento da contribuição da via dos fosfagênios assim como capacidade de manter o desempenho de RSA também foi melhorada, muito provavelmente, influenciada pela melhora do sistema oxidativo. Entretanto, o HIIT não apresentou efetividade contra a instauração da fadiga neuromuscular induzida pelo RSA e apenas uma discreta atenuação da fadiga periférica induzida pelo T_{INC} (menor variação dos saltos verticais em A2).

7.2. FASE 2

A FASE 2 do presente projeto de pesquisa visou investigar os possíveis efeitos ergogênicos da suplementação de β -Alanina, simulando um contexto prático e aplicável uma vez que esse tipo de estratégia de suplementação comumente apresentasse em conjunto com períodos de treinamento. Dessa forma, a FASE 2 isola os possíveis benefícios da suplementação desse aminoácido, visto que o HIIT foi realizado de maneira idêntica por ambos os grupos.

Inicialmente é importante retomar o mecanismo pelo qual a suplementação de β -Alanina agiria como recurso ergogênico. A β -Alanina é o fator limitante para a síntese de carnosina, dipeptídeo encontrado em alta concentração no músculo esquelético de mamíferos e que age como importante tamponante na célula muscular (ARTIOLI et al., 2010). Dessa forma, a partir do aumento significativo do conteúdo de carnosina intramuscular do G β quando comparado com GP, é possível afirmar que a suplementação de β -Alanina é uma estratégia eficiente para o aumento de carnosina intramuscular, assim como extensivamente reportado na literatura (COCHRAN et al., 2015; HILL et al., 2007; SAUNDERS et al., 2017a).

Apesar do exercício físico ser um fator que poderia contribuir para o aumento do conteúdo de carnosina intramuscular (DERAVE et al., 2010), e dessa forma a FASE 1 ter agido como um estímulo positivo previamente à administração de β -Alanina, os níveis iniciais desse dipeptídeo não foram diferentes entre os grupos (G β : $19,7 \pm 5,4$ mmol.kg⁻¹ músculo seco; GP: $20,8 \pm 6,6$ mmol.kg⁻¹ músculo seco). Ainda, embora a impossibilidade de mensurar o conteúdo de carnosina intramuscular na linha de base (previamente a FASE 1) não permitir evidências mais conclusivas em relação ao efeito do HIIT isolado sob essa variável, os valores iniciais reportados no presente estudo são coerentes com a literatura (mensuração por meio da técnica de HPLC ~20 mmol.kg⁻¹ de músculo seco) (HILL et al., 2007; KENDRICK et al., 2009; MANNION; JAKEMAN; WILLAN, 1994; SAUNDERS et al., 2017a), contribuindo com outros estudos que não verificaram influência de diferentes modelos de treino no conteúdo de carnosina intramuscular em indivíduos omnívoros (não vegetarianos), moderadamente ativos após períodos de treinamento (BAGUET et al., 2011; KENDRICK et al., 2008, 2009; MANNION; JAKEMAN; WILLAN, 1994).

Em relação ao T_{INC}, foram observadas melhoras significativas do $\dot{V}O_{2max}$ (tanto absoluto, quanto relativo ao peso corporal) e da V_{max} para ambos os grupos, sendo que somente o G β apresentou maiores valores de [La]_{pico} após a intervenção. Ainda, a análise da magnitude do efeito apontou inferência favorável ao G β em relação ao $\dot{V}O_{2max}$ absoluto quando comparado com o GP. Zoeller et al. (2007) não verificaram aumento significativo do $\dot{V}O_{2max}$ absoluto (Pré: $2,83 \pm 0,71$ L.min⁻¹; Pós: $2,86 \pm 0,78$ L.min⁻¹) após 4 semanas de suplementação de 1,6 g de β -Alanina, sem nenhuma intervenção de treinamento. Similarmente, Cochran et al. (2015) também não verificaram aumento significativo do $\dot{V}O_{2max}$ relativo ao peso corporal (Pré: $48,1 \pm 6,9$ mL⁻¹.kg⁻¹.min; Pós: $52,2 \pm 4,3$ mL⁻¹.kg⁻¹.min) após 6 semanas de suplementação de 3,2 g de β -Alanina associada à treinamento de *sprints* repetido (SIT - modalidade específica de HIIT). Finalmente,

Van Thienen et al. (2009) não verificaram aumento significativo do $\dot{V}O_{2\max}$ absoluto em ciclistas treinados após 8 semanas de suplementação de β -Alanina (dosagem aumentada gradualmente de 2 – 4 g.dia⁻¹).

Todos os trabalhos citados anteriormente não reportaram resultados benéficos da suplementação de β -Alanina quanto à capacidade de aumento do $\dot{V}O_{2\max}$, entretanto todos os trabalhos utilizaram dosagem de suplementação de β -Alanina inferiores ao presente estudo. Hobson et al. (2012) verificaram em artigo de meta-análise que a quantidade de β -Alanina acumulada durante o protocolo de suplementação é determinante para obtenção de efeitos positivos e deve ser maior que 179 g de β -Alanina. Dentre os 3 estudos citados, somente Van Thienen et al. (2009) realizaram protocolo de suplementação que contemplou valores acima do indicado por Hobson et al. (2012) (Zoeller et al. = 108,8 g; Cochran et al. 2015 = 134,4 g; Van Thienen et al. = 182 g). Dessa forma, apesar do presente estudo ter apresentado efeito benéfico da suplementação de β -Alanina somente quando analisada a magnitude do efeito, é possível que a quantidade de β -Alanina suplementada/acumulada (presente estudo: 268,8 g de β -Alanina acumulada em 6 semanas de suplementação), possa ser um fator que influencie na obtenção de resultados positivos, mesmo que discretos, em relação ao $\dot{V}O_{2\max}$.

A repetição de *sprints* em intensidade superiores ao $\dot{V}O_{2\max}$, com curtos períodos de recuperação é responsável por diminuir significativamente o pH intramuscular devido à alta produção e consequente acúmulo de íons H⁺ provenientes da intensa hidrólise da molécula de ATP (BISHOP et al., 2004; GAITANOS et al., 1993; MENDEZ-VILLANUEVA et al., 2012). Logo, a suplementação de β -Alanina (e consequentemente o aumento do conteúdo de carnosina intramuscular) poderia significar uma estratégia interessante objetivando a supressão da ação deletéria do acúmulo de íons H⁺, e dessa forma colaborando para aumento/manutenção do desempenho de *sprints* repetidos.

De maneira surpreendente, poucos estudos se dedicaram a essa investigação, Brisola et al. (2016) observaram resultados *Provavelmente benéficos* (análise da magnitude do efeito) da suplementação de β -Alanina em *sprints* repetidos realizados na natação por jogadores profissionais de polo aquático (6×10 m, intervalo de 17 s), resultados similares aos reportados por Claus et al. (2017) para jovens jogadores de polo aquático. Por outro lado, Sweeney et al. (2010), Ducker et al. (2013) e Milioni et al. (2017a), não verificaram efeito ergogênico da suplementação de β -Alanina em *sprints* repetidos realizados em corrida (esteira não-motorizada, pista de corrida e *sprints* com mudança de direção, respectivamente).

O presente estudo verificou diminuição significativa do Tempo Total, e do Melhor Tempo somente para o G β , além disso, a análise da magnitude do efeito apontou para inferências favoráveis ao G β (*Provavelmente e Muito provavelmente G β*) para o Tempo Total e Melhor Tempo. Dessa forma, apesar de não haver uma medida direta para verificação da capacidade de tamponamento intramuscular durante a execução dos *sprints* repetidos bem como a capacidade de tamponamento *in vitro* não ter apresentado aumento significativo (músculo em repouso), talvez o aumento do conteúdo de carnosina intramuscular possa ter desempenhado uma ação protetiva contra o acúmulo de íons H⁺ durante o RSA e conseqüentemente contribuído para o aumento do desempenho na tarefa investigada.

Essa teoria se fortalece uma vez que não foi verificado aumento da Capacidade Anaeróbia (contribuição do metabolismo glicolítico e contribuição do metabolismo dos fosfagênios) em nenhum dos grupos investigados, sendo que a análise da magnitude do efeito apontou para resultados *Não claros* entre os grupos. A ausência de resultados positivos da intervenção em relação ao metabolismo anaeróbio faz com que as melhoras verificadas durante o RSA sejam possivelmente resultantes de outro mecanismo, e o aumento da capacidade tamponante durante o RSA, via o aumento do conteúdo de carnosina intramuscular, pode ser o responsável por esse

resultado, entretanto, não há até o presente momento nenhuma técnica capaz de monitorar a capacidade de tamponamento em tempo real, ou seja, durante a execução dos *sprints*.

Em relação ao T_{LIM} , Hill et al. (2007) verificaram aumento inicial de 13,0% e adicional de 3,2% no trabalho total realizado em cicloergômetro (intensidade \times Tempo Limite) na quarta e décima semana de suplementação de β -Alanina, respectivamente. Saunders et al. (2017a) administraram $6,4 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}$ de β -Alanina durante 24 semanas em indivíduos saudáveis e a cada 4 semanas de suplementação, realizaram teste a 110% da potência máxima atingida em teste incremental em cicloergômetro. O grupo suplementado com β -Alanina apresentou resultados em relação ao desempenho no teste que variaram entre *Possivelmente* até *Certamente positivos* (análise da magnitude do efeito) em relação a semana zero, algo não verificado para o grupo placebo.

Entretanto a comparação entre os estudos citados e o presente estudo deve ser feita com cautela, uma vez que há diferenças importantes entre a comparação dos resultados provenientes de avaliações em cicloergômetro e corrida (REDKVA et al., 2018). Por outro lado, similarmente ao presente estudo, Jagim et al. (2013) não verificaram qualquer alteração significativa no Tempo Limite em corrida em esteira realizado a 115% do $\dot{V}O_{2max}$ após 5 semanas de suplementação de β -Alanina.

As avaliações neuromusculares demonstraram que os saltos verticais foram suficientemente sensíveis para detectar a fadiga instaurada em ambos os protocolos, uma vez que a modalidade de saltos verticais utilizada no presente projeto (*counter movement jump*) reflete propriedades de ativação e contratilidade muscular (BUCHHEIT; LAURSEN, 2013b). Tanto o T_{INC} , quanto o RSA induziram queda significativa da altura atingida nos saltos após os protocolos de testes aplicados, entretanto no momento A3 a variação absoluta do GP foi estatisticamente maior que em A2 quando aplicado o T_{INC} , algo não verificado para o $G\beta$. A partir desse resultado

é possível especular que o aumento de carnosina intramuscular desempenhou ação protetiva durante esforço progressivo (T_{INC}), atenuando a fadiga neuromuscular instaurada. Corroborando com o presente resultado, Carpentier et al. (2015) realizaram dois meses de treinamentos pliométricos associados a suplementação de β -Alanina ($4 - 5,6 \text{ g.dia}^{-1}$) em indivíduos saudáveis e verificaram melhora discreta da altura do maior salto (*counter movement jump*) e do decréscimo de *performance* durante série de 45 saltos consecutivos quando comparado com o grupo suplementado com substância placebo.

Um possível mecanismo pelo qual a suplementação de β -Alanina atuaria como um fator protetivo contra a instauração do processo de fadiga neuromuscular foi investigado por Dutka e Lamb (2004). Os autores verificaram em fibras musculares isoladas uma possível interação entre carnosina e facilitação do processo excitação-contração muscular via aumento da sensibilidade da fibra muscular ao Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático. Por outro lado, Hannah et al. (2015) não confirmaram tal hipótese quando conduziram importante estudo *in vivo* no qual investigaram a relação de produção de força e frequência de estimulação em participantes saudáveis suplementados com β -Alanina durante 28 dias. Nesse estudo, os participantes não apresentaram diferenças significativas (nem com a condição pré suplementação, nem com o grupo placebo) para força máxima voluntária de extensão de joelho, força evocada por estímulo elétrico no músculo relaxado, força evocada por estímulo elétrico após potenciação do músculo e curva força-frequência de estimulação durante série de 8 estímulos consecutivos com frequência progressiva.

A presente pesquisa também verificou resultados discretos em relação as avaliações neuromusculares, sendo que o protocolo de contrações isométricas voluntárias máximas e estimulação elétrica periférica são sensíveis suficientes para detecção dos componentes periféricos e centrais da fadiga neuromuscular, uma vez que ambos os protocolos de teste induziram diminuições significativas de variáveis que indicam fadiga periférica (como a T_{HF} e

T_{LF}) e fadiga central (AV e RMS_VL). Entretanto, é importante ressaltar que uma das poucas interações estatísticas entre grupos verificadas no presente estudo aponta maiores valores de AV do G β após o RSA no momento A3 quando comparado com o GP no mesmo momento, o que pode indicar uma discreta proteção que a suplementação de β -Alanina representaria contra a instauração do processo de fadiga central durante a repetição de *sprints*.

Uma importante limitação do presente estudo deve ser reconhecida. O longo tempo de atraso para realizar as contrações isométricas voluntárias máximas e estimulações elétricas periféricas (~ 4 min) podem ter subestimado o real estado de fadiga neuromuscular induzida imediatamente após os protocolos de teste, uma vez que recuperação substancial pode ocorrer em minutos (MILIONI et al., 2016a), e esta pode ser a razão para a ausência de uma diminuição significativa de algumas variáveis medidas, especialmente relacionadas à fadiga periférica. Dessa forma, os possíveis benefícios que a suplementação de β -Alanina potencialmente representaria em relação a proteção contra a fadiga neuromuscular instaurada por esforços intensos merece maior atenção, uma vez que, apesar de discretos até o momento, são promissores os resultados reportados na literatura e no presente estudo.

As análises biomoleculares revelaram diferenças não significativas para todas as proteínas/enzimas mensuradas. Ao melhor do nosso conhecimento, não há estudos que investigaram a influência da suplementação de β -Alanina em proteínas/enzimas ligadas ao metabolismo anaeróbico. A tendência de um aumento significativo de HIF-1 α para o G β em comparação ao GP após a intervenção (G β em A3 x GP em A3 *post hoc*: $p = 0,06$) alinha-se com o resultado *Possivelmente positivo* para $\dot{V}O_{2max}$ absoluto do mesmo grupo uma vez que a HIF-1 α é um dos mais potentes fatores de transcrição genica para adaptações aeróbicas (VAN THIENEN et al., 2017). Ainda, Schnuck et al. (2016) verificaram o aumento de outros marcadores biomoleculares de adaptações oxidativas em cultura de célula tratada com β -Alanina, tais como receptor ativado

de proliferador de peroxissoma β/δ (PPAR β/δ) e o fator de transcrição mitocondrial (TFAM). A ausência de resultados significativos para PGC-1 α possivelmente se deve ao fato do conteúdo dessa proteína ter sido mensurada no citoplasma celular ao invés de especificamente no núcleo da célula muscular (LITTLE et al., 2010).

Além disso, o aumento significativo da [La]_{pico} após T_{INC} e RSA apenas para o G β concorda com a tendência de aumento do conteúdo de MCT4 para esse grupo após a intervenção (G β em A2 x G β em A3 *post hoc*: $p = 0,10$), apesar de não haver significância estatística para esse resultado, talvez em função do considerável desvio-padrão. É importante ressaltar que alguns recentes estudos não verificaram alteração do conteúdo de MCT4 após modelos semelhantes de HIIT, inclusive colocando em dúvida se o acúmulo de lactato e H⁺ induzido pelo esforço são realmente importantes como fatores de sinalização da abundância dessa proteína (MCGINLEY; BISHOP, 2016a, 2016b, 2017), o que faz do resultado encontrado na presente tese um indicativo para novas investigações em relação à influência da suplementação de β -Alanina no conteúdo de transportadores monocarboxilados de membrana.

Apesar da maior parte dos estudos que investigaram a capacidade de tamponamento *in vitro* em resposta a suplementação de β -Alanina terem reportado resultados positivos (DANAHER et al., 2014; HILL et al., 2007), o presente estudo não verificou alteração significativa em função da intervenção realizada, assim como Gross et al. (2014). Novamente, apesar de visualmente haver tendência de aumento da capacidade de tamponamento *in vitro* para o G β (+14,4%), o alto coeficiente de variação reportado para essa técnica (MCGINLEY; BISHOP, 2016a, 2016b) pode ter diminuído a sensibilidade para detecção de um possível efeito positivo da intervenção. Além disso, mais uma vez é importante ressaltar que a técnica foi realizada no músculo em condição de repouso, e que não há técnica capaz do monitoramento em tempo real da capacidade de

tamponamento do músculo durante o esforço, permanecendo a real influência da suplementação de β -Alanina uma questão a ser investigada.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na presente tese apontam que o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) se mostrou efetivo em induzir melhoras substanciais da capacidade oxidativa e sistema cardiorrespiratório. Ainda, apesar de discreta, o modelo de HIIT proposto induziu o aumento da Capacidade Anaeróbia leve atenuação da fadiga neuromuscular induzida por esforço progressivo (T_{INC}), possivelmente em função do aumento no limiar sensitivo da ação inibitória do grupo III/IV aferente, permitindo maior trabalho do músculo durante o exercício. Portanto, a FASE 1 (somente HIIT) foi eficaz em proporcionar adaptações iniciais aos participantes do estudo, o que possivelmente pode ter contribuído para verificação mais clara dos possíveis efeitos da suplementação de β -Alanina administrada na FASE 2.

A influência da suplementação de β -Alanina nas adaptações do sistema oxidativo foram apenas marginais e devem ser assumidas com cautela uma vez que os resultados favoráveis ao $G\beta$ em relação ao $\dot{V}O_{2max}$ foram verificados de forma discreta somente pela análise baseada na magnitude do efeito. Apesar de não haver aumento significativo da PGC-1 α , a HIF-1 α outro importante fator de transcrição gênica para adaptações aeróbias apresentou clara tendência de aumento significativo de sua abundância citoplasmática para o $G\beta$ quando comparado ao GP, alinhando-se com o resultado anterior. Ainda, a partir de uma análise de estudos prévios, é possível especular que talvez essa melhora seja influenciada pela quantidade de β -Alanina acumulada ao longo do protocolo de suplementação.

Em resposta à pergunta central do presente estudo, a suplementação de β -Alanina ocasionou melhora significativa de variáveis do RSA, tais como diminuição do tempo total de teste e do melhor tempo registrado, ambas confirmadas pela análise da magnitude do efeito entre os dois grupos do presente estudo. Surpreendentemente, as melhoras registradas para o $G\beta$ em relação ao desempenho no RSA não foram acompanhadas por variáveis do metabolismo

anaeróbio, uma vez que não houveram aumentos significativos da Capacidade Anaeróbia (a análise da magnitude do efeito entre os grupos revelou inferência *Não clara*) e do conteúdo citoplasmático de LDH e PFK, importantes enzimas da via glicolítica.

Por outro lado, o G β registrou maiores valores de ativação voluntária após a realização do RSA em comparação com o GP, o que significava a manutenção do *drive* motor (e consequentemente menor fadiga central) mesmo sob estresse fisiológico intenso gerado pelo teste. Sem ser possível identificar uma relação causa-efeito, é possível que o substancial aumento de carnosina intramuscular induzido pelo protocolo de suplementação de β -Alanina tenha aumentado a capacidade de suprimir a ação da acidose durante o RSA, proporcionando a manutenção do *drive* motor, (assim como de outros processos fisiológicos) e colaborando com melhores resultados do G β durante o RSA. Entretanto, a capacidade de tamponamento *in vitro* (músculo em repouso) não foi significativamente alterada.

9. CONCLUSÃO

Dessa forma, é possível concluir que a associação entre a suplementação de β -Alanina e treinamento intervalado de alta intensidade induziram a melhora da *performance* de *sprints* repetidos. Os mecanismos que contribuíram para esses resultados possivelmente estão ligados ao aumento de carnosina intramuscular observado somente no G β , o qual pode ter contribuído para diminuição dos efeitos deletérios do acúmulo de íons H⁺ durante os *sprints*, apesar da capacidade de tamponamento *in vitro* do músculo em repouso não ter aumentado significativamente. A melhora significativa do metabolismo aeróbio bem como a atenuação da fadiga neuromuscular (em especial fadiga central) também podem ter contribuído para redução da queda de *performance* durante os *sprints*. Por outro lado, a ausência de alterações significativas da capacidade anaeróbia, bem como das proteínas/enzimas ligadas ao metabolismo anaeróbio geram a necessidade de futuras investigações na tentativa de esclarecer a influência da suplementação de β -Alanina associada ao treinamento intervalado de alta intensidade no metabolismo anaeróbio.

10. REFERÊNCIAS

AAGAARD, P. et al. Neural adaptation to resistance training: changes in evoked V-wave and H-reflex responses. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 6, p. 2309–2318, 2002.

ABE, H. Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Proton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 7, p. 757–765, 2000.

ALLEN, D. G.; LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. **Physiological reviews**, v. 88, n. 1, p. 287–332, 2008.

AMANN, M. Central and peripheral fatigue: Interaction during cycling exercise in humans. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 11, p. 2039–2045, 2011.

AMANN, M. et al. Implications of group III and IV muscle afferents for high-intensity endurance exercise performance in humans. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 21, p. 5299–5309, 2011.

AMANN, M. et al. Peripheral fatigue limits endurance exercise via a sensory feedback-mediated reduction in spinal motoneuronal output. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 3, p. 355–364, 2013.

ARTIOLI, G. G. et al. Role of β -alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 6, p. 1162–1173, 2010.

ASATOOR, A. M. et al. Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man. **Gut**, v. 11, n. 3, p. 250–254, 1970.

BAGUET, A. et al. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 3, p. 837–842, 2009.

BAGUET, A. et al. Important role of muscle carnosine in rowing performance. **Journal of**

Applied Physiology, v. 109, n. 4, p. 1096–1101, 2010.

BAGUET, A. et al. Effects of sprint training combined with vegetarian or mixed diet on muscle carnosine content and buffering capacity. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 10, p. 2571–2580, 2011.

BAGUET, A. et al. The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 13–20, 2012.

BAKER, L. B. et al. Acute effects of carbohydrate supplementation on intermittent sports performance. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5733–5763, 2015.

BAUER, K.; SCHULZ, M. Biosynthesis of carnosine and related peptides by skeletal muscle cells in primary culture. **Eur. J. Biochem.**, v. 219, p. 43–47, 1994.

BELLINGER, P. M.; MINAHAN, C. L. The effect of β -alanine supplementation on cycling time trials of different length. **European Journal of Sport Science**, v. 16, n. 7, p. 829–836, 2016.

BENEKE, R.; LEITHAUSER, R. M.; OCHENTEL, O. Blood lactate diagnostics in exercise testing and training. **Int J Sports Physiol Perform**, v. 6, n. 1, p. 8–24, 2011.

BERTUZZI, R. C. M. et al. Predicting MAOD using only a supramaximal exhaustive test. **International Journal of Sports Medicine**, v. 31, n. 7, p. 477–481, 2010.

BEX, T. et al. Exercise training and beta-alanine-induced muscle carnosine loading. **Frontiers in Nutrition**, v. 2, n. May, p. 1–6, 2015.

BILLAUT, F. et al. Interaction of Central and Peripheral Factors during Repeated Sprints at Different Levels of Arterial O₂ Saturation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.

BISHOP, D. et al. Induced Metabolic Alkalosis Affects Muscle Metabolism and Repeated-Sprint

Ability. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, p. 807–813, 2004.

BISHOP, D. et al. Effects of high-intensity training on muscle lactate transporters and postexercise recovery of muscle lactate and hydrogen ions in women. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 6, p. R1991–R1998, 2008a.

BISHOP, D. et al. Effects of high-intensity training on muscle lactate transporters and postexercise recovery of muscle lactate and hydrogen ions in women. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 6, p. R1991–R1998, 2008b.

BISHOP, D.; EDGE, J.; GOODMAN, C. Muscle buffer capacity and aerobic fitness are associated with repeated-sprint ability in women. **European Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4–5, p. 540–547, 2004.

BLANCQUAERT, L. et al. Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by β -alanine transamination. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 17, p. 4849–4863, 2016.

BLANCQUAERT, L.; EVERAERT, I.; DERAIVE, W. Beta-alanine supplementation , muscle carnosine and exercise performance. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 18, p. 63–70, 2015.

BOLDYREV, A. A. Carnosine : New Concept for the Function of an Old Molecule. **Biochemistry (Moscow)**, v. 77, n. 4, p. 313–326, 2012.

BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiol Rev**, v. 98, p. 1803–1845, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRISOLA, G. M. P. et al. Effects of four weeks of β -alanine supplementation on repeated sprint ability in water polo players. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–13, 2016.

BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: Cardiopulmonary emphasis. **Sports Medicine**, v. 43, n. 5, p. 313–338, 2013a.

BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part II: Anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. **Sports Medicine**, v. 43, n. 10, p. 927–954, 2013b.

CAMPOS, E. Z. et al. Efeito das cargas de treinamento sobre parâmetros fisiológicos de futebolistas. **Motriz. Revista de Educacao Fisica**, v. 19, n. 2, p. 487–493, 2013.

CARPENTIER, A. et al. β -Alanine supplementation slightly enhances repeated plyometric performance after high-intensity training in humans. **Amino Acids**, v. 47, n. 7, p. 1479–1483, 2015.

CHRISTENSEN, P. M. et al. Unchanged content of oxidative enzymes in fast-twitch muscle fibers and kinetics after intensified training in trained cyclists. **Physiological Reports**, v. 3, n. 7, p. e12428, 2015.

CLAUS, G. M. et al. Beta-Alanine Supplementation Improves Throwing Velocities in Repeated Sprint Ability and 200-m Swimming Performance in Young Water Polo Players. **Pediatric Exercise Science**, v. 29, p. 203–212, 2017.

COCHRAN, A. J. R. et al. β -Alanine Supplementation Does Not Augment the Skeletal Muscle Adaptive Response to 6 Weeks of Sprint Interval Training. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 25, p. 541–549, 2015.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. Hillsdale:

MI:LawrenceErlbaum, 1988. v. 2nd

COSTILL, D. et al. Acid-Base Balance during Repeated Bouts of Exercise: Influence of HCO₃. **International Journal of Sports Medicine**, v. 5, n. 5, p. 228–231, 1984.

DANAHER, J. et al. The effect of β -alanine and NaHCO₃ co-ingestion on buffering capacity and exercise performance with high-intensity exercise in healthy males. **European Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 8, p. 1715–1724, 2014.

DE SALLES PAINELLI, V. et al. The ergogenic effect of beta-alanine combined with sodium bicarbonate on high-intensity swimming performance. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 38, n. 5, p. 525–532, 2013.

DEBOLD, E. P. Recent insights into muscle fatigue at the cross-bridge level. **Frontiers in Physiology**, v. 3 JUN, n. June, p. 1–14, 2012.

DÉCOMBAZ, J. et al. Effect of slow-release beta-alanine tablets on absorption kinetics and paresthesia. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 67–76, 2012.

DERAVE, W. et al. Muscle Carnosine Metabolism and β -Alanine Supplementation in Relation to Exercise and Training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 3, p. 247–263, 2010.

DI PRAMPERO, P. E.; FERRETTI, G. The energetics of anaerobic muscle metabolism: A reappraisal of older and recent concepts. **Respiration Physiology**, v. 118, n. 2–3, p. 103–115, 1999.

DUCKER, K. J.; DAWSON, B.; WALLMAN, K. E. Effect of beta-alanine and sodium bicarbonate supplementation on repeated sprint performance. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 27, n. 12, p. 3450–3460, 2013.

DUTKA, T. L. et al. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca²⁺ sensitivity and

sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in human skeletal muscle fibers. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, p. 728–736, 2012.

DUTKA, T. L.; LAMB, G. D. Effect of carnosine on excitation – contraction coupling in mechanically-skinned rat skeletal muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 25, p. 203–213, 2004.

EDGE, J. et al. Effects of high- and moderate-intensity training on metabolism and repeated sprints. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 37, n. 11, p. 1975–1982, 2005.

ENOKA, R. M.; DUCHATEAU, J. Muscle fatigue: what, why and how it influences muscle function. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 1, p. 11–23, 2008.

FABIATO, B. Y. A.; FABIATO, F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. **Journal of physiology**, v. 276, p. 233–255, 1978.

FERNANDEZ-DEL-OLMO, M. et al. Isometric knee extensor fatigue following a Wingate test: Peripheral and central mechanisms. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 23, n. 1, p. 57–65, 2013.

FITTS, R. H. The role of acidosis in fatigue: Pro perspective. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 48, n. 11, p. 2335–2338, 2016.

FITZSIMONS, M. et al. Cycling and running tests of repeated sprint ability. **Australian Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 25, p. 82–87, 1993.

FOSTER, C. Monitoring training in athletes with reference to overtraining syndrome. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 30, n. 7, p. 1164–1168, 1998.

FRITZSON, P. THE CATABOLISM OF C¹⁴-LABELED URACIL, DIHYDROURACIL, AND

BETA-UREIDOPROPIONIC ACID IN RAT LIVER SLICES. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 223–228, 1956.

GAITANOS, G. C. et al. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 2, p. 712–719, 1993.

GANDEVIA, S. C. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. **Physiological reviews**, v. 81, n. 4, p. 1725–1789, 2001.

GIBALA, M. Molecular responses to high-intensity interval exercise This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 14th International Biochemistry of Exercise Conference – Muscles as Molecular and Metabolic Machines, and has under. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 428–432, 2009.

GIBALA, M. J. et al. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 5, p. 1077–1084, 2012.

GIRARD, O. et al. Neuro-mechanical determinants of repeated treadmill sprints - Usefulness of an “hypoxic to normoxic recovery” approach. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–14, 2015.

GIRARD, O.; BISHOP, D. J.; RACINAIS, S. Neuromuscular adjustments of the quadriceps muscle after repeated cycling sprints. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.

GLENN, J. M. et al. Effects of Acute Beta-Alanine Supplementation on Anaerobic Performance in Trained Female Cyclists. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 61, n. 2, p. 161–166, 2015.

GRAEF, J. L. et al. The effects of four weeks of creatine supplementation and high-intensity interval training on cardiorespiratory fitness: A randomized controlled trial. **Journal of the**

International Society of Sports Nutrition, v. 6, p. 1–7, 2009.

GROSS, M. et al. Effects of beta-alanine supplementation and interval training on physiological determinants of severe exercise performance. **European Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 2, p. 221–234, 2014.

HANNAH, R. et al. β -Alanine supplementation enhances human skeletal muscle relaxation speed but not force production capacity. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 5, p. 604–612, 2015.

HARGREAVES, M. et al. Muscle metabolites and performance during high-intensity , intermittent exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 84, n. 5, p. 1687–1691, 1998.

HARMER, A R. et al. Skeletal muscle metabolic and ionic adaptations during intense exercise following sprint training in humans. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 89, n. 5, p. 1793–1803, 2000.

HARRIS, R. C. et al. The time course of phosphorylcreatine resynthesis during recovery of the quadriceps muscle in man. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 367, n. 2, p. 137–142, 1976.

HARRIS, R. C. et al. The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. **Amino Acids**, v. 30, n. 3 SPEC. ISS., p. 279–289, 2006.

HARRIS, R. C.; DUNNETT, M.; GREENHHAFF, P. L. Carnosine and taurine contents in individual fibres of human vastus lateralis muscle. **Journal of Sports Sciences**, v. 16, p. 639–643, 1998.

HERMANSEN, L.; HULTMAN, E.; SALTIN, B. Muscle Glycogen during Prolonged Severe Exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 71, n. 2–3, p. 129–139, 1967.

HILL, C. A. et al. Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. **Amino Acids**, v. 32, n. 2, p. 225–233, 2007.

HIPKISS, A. R.; MICHAELIS, J.; SYRRIS, P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. **FEBS Letters**, v. 371, p. 81–85, 1995.

HOBSON, R. M. et al. Effects of β -alanine supplementation on exercise performance: A meta-analysis. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 25–37, 2012.

HOPKINS, W. G. et al. Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 1, p. 3–12, 2009.

HOSTRUP, M.; BANGSBO, J. Improving beta-alanine supplementation strategy to enhance exercise performance in athletes. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 17, p. 4701–4702, 2016.

HOWLEY, E. T.; BASSETT, D. R.; WELCH, H. G. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 27, n. 9, p. 1292–1301, 1995.

HUREAU, T. J. et al. Exercise performance is regulated during repeated sprints to limit the development of peripheral fatigue beyond a critical threshold. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 7, p. 951–963, 2014.

JAGIM, A. R. et al. Effects of beta-alanine supplementation on sprint endurance. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 27, n. 2, p. 526–532, 2013.

KALYANKAR, G.; MEISTER, A. Enzymatic Synthesis of Carnosine and Related Beta-Alanyl and Gama-Aminobutyryl Peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 224, n. 12, p. 3210–3218, 1959.

KENDRICK, I. P. et al. The effects of 10 weeks of resistance training combined with β -alanine supplementation on whole body strength, force production, muscular endurance and body

composition. **Amino Acids**, v. 34, n. 4, p. 547–554, 2008.

KENDRICK, I. P. et al. The effect of 4 weeks beta-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 1, p. 131–138, 2009.

KOOISTRA, R. D.; DE RUITER, C. J.; DE HAAN, A. Conventionally assessed voluntary activation does not represent relative voluntary torque production. **European Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 3, p. 309–320, 2007.

KUIPERS, H. et al. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. **International journal of sports medicine**, v. 6, n. 4, p. 197–201, 1985.

LAURSEN, P. B. Training for intense exercise performance: high-intensity or high-volume training? **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 20, p. 1–10, 2010.

LITTLE, J. P. et al. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 6, p. 1011–1022, 2010.

MANNION, A. F. et al. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 64, p. 47–50, 1992.

MANNION, A. F.; JAKEMAN, P. M.; WILLAN, P. L. T. Effects of isokinetic training of the knee extensors on high-intensity exercise performance and skeletal muscle buffering. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 68, n. 4, p. 356–361, 1994.

MATTHEWS, M. M.; TRAUTS, T. W. Regulation of N-Carbamoyl-Beta-alanine Amidohydrolase, the Terminal Enzyme in Pyrimidine Catabolism, by Ligand-induced Change in

Polymerization. **The journal of biological chemistry**, v. 262, n. 15, p. 7232–7237, 1987.

MCCARTY, M. F.; DINICOLANTONIO, J. J. β -Alanine and orotate as supplements for cardiac protection. **Open Heart**, v. 4, n. 1, p. 2–5, 2014.

MCGAWLEY, K.; BISHOP, D. J. Oxygen uptake during repeated-sprint exercise. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 18, n. 2, p. 214–218, 2015.

MCGINLEY, C.; BISHOP, D. J. Influence of training intensity on adaptations in acid/base transport proteins, muscle buffer capacity, and repeated-sprint ability in active men. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 6, p. 1290–1305, 2016a.

MCGINLEY, C.; BISHOP, D. J. Distinct protein and mRNA kinetics of skeletal muscle proton transporters following exercise can influence interpretation of adaptations to training. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 12, p. 1565–1580, 2016b.

MCGINLEY, C.; BISHOP, D. J. Rest interval duration does not influence adaptations in acid/base transport proteins following 10 wk of sprint-interval training in active women. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 5, p. R702–R717, 2017.

MENDEZ-VILLANUEVA, A. et al. The Recovery of Repeated-Sprint Exercise Is Associated with PCr Resynthesis, while Muscle pH and EMG Amplitude Remain Depressed. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 4–13, 2012.

MERTON, P. A. Interaction between muscle fibres in a twitch. **Journal of Physiology**, v. 124, p. 311–324, 1954.

METZGER, J. M.; MOSS, R. L. Greater hydrogen ion-induced depression of tension and velocity in skinned single fibres of rat fast than slow muscles. **Journal of physiology**, v. 393, p. 727–742,

1987.

MILIONI, F. et al. Futsal match-related fatigue affects running performance and neuromuscular parameters but not finishing kick speed or accuracy. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1–10, 2016a.

MILIONI, F. et al. Acute administration of high doses of taurine does not substantially improve high-intensity running performance and the effect on maximal accumulated oxygen deficit is unclear. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 41, n. 5, p. 498–503, 2016b.

MILIONI, F. et al. Energy systems contribution in the running-based anaerobic sprint test. **International Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 3, p. 226–232, 2017a.

MILIONI, F. et al. Energy systems contribution in the running-based anaerobic sprint test. **Int J Sports Med**, v. 38, n. 3, p. 226–232, 2017b.

MILIONI, F. et al. Six weeks of β -alanine supplementation did not enhance repeated-sprint ability or technical performances in young elite basketball players. **Nutrition and Health**, v. 23, n. 2, p. 111–118, 2017c.

MILLET, G. Y. et al. Electrical stimulation for testing neuromuscular function: From sport to pathology. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 10, p. 2489–2500, 2011.

MINETT, G. M.; DUFFIELD, R. Is recovery driven by central or peripheral factors? A role for the brain in recovery following intermittent-sprint exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 5 FEB, n. February, p. 1–9, 2014.

MIYAGI, W. E. et al. Anaerobic capacity estimated in a single supramaximal test in cycling: Validity and reliability analysis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42485, 2017.

MORA, L.; SENTANDREU, M. A.; TOLDRÁ, F. Hydrophilic chromatographic determination

of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4664–4669, 2007.

NEVES, M. et al. Incidence of adverse events associated with percutaneous muscular biopsy among healthy and diseased subjects. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 22, n. 2, p. 175–178, 2012.

NORDSBORG, N. et al. Muscle interstitial potassium kinetics during intense exhaustive exercise: effect of previous arm exercise. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 1, p. R143–R148, 2003.

O'LEARY, T. J. et al. Central and peripheral fatigue following non-exhaustive and exhaustive exercise of disparate metabolic demands. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 26, n. 11, p. 1287–1300, 2016.

PARK, Y. J.; VOLPE, S. L.; DECKER, E. A. Quantitation of Carnosine in Humans Plasma after Dietary Consumption of Beef. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 4736–4739, 2005.

PARKHOUSE, W. S. et al. Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 58, p. 14–17, 1985.

PATE, E. et al. Reduced effect of pH on skinned rabbit psoas muscle mechanics at high temperatures : implications for fatigue. **Journal of Physiology**, v. 486, n. 3, p. 689–694, 1995.

PAUW, K. DE et al. Guidelines to classify subject groups in sport- science research. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 8, p. 111–122, 2013.

PERREY, S. et al. Neural and muscular adjustments following repeated running sprints. **European Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 6, p. 1027–1036, 2010.

PLACE, N. et al. Comparison of quadriceps inactivation between nerve and muscle stimulation. **Muscle and Nerve**, v. 42, n. 6, p. 894–900, 2010.

RACINAIS, S. et al. Muscle deoxygenation and neural drive to the muscle during repeated sprint cycling. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 2, p. 268–274, 2007.

RAVIER, G. et al. Impressive anaerobic adaptations in elite karate athletes due to few intensive intermittent sessions added to regular karate training. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 19, n. 5, p. 687–694, 2009.

REDKVA, P. E. et al. Anaerobic capacity estimated by the sum of both oxygen equivalents from the glycolytic and phosphagen pathways is dependent on exercise mode: running versus cycling. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–11, 2018.

RICCIARDI, L. et al. Effects of acidosis on maximum shortening velocity and force-velocity relation of skinned rat cardiac muscle. **J Mol Cell Cardiol**, v. 26, p. 601–607, 1994.

SALE, C. et al. Carnosine: From exercise performance to health. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1477–1491, 2013.

SALE, C.; SAUNDERS, B.; HARRIS, R. C. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. **Amino Acids**, v. 39, p. 321–333, 2010.

SAUNDERS, B. et al. Twenty-four Weeks of Beta-Alanine Supplementation on Carnosine Content, Related Genes, and Exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 49, n. 5, p. 896–906, 2017a.

SAUNDERS, B. et al. β -alanine supplementation to improve exercise capacity and performance : a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 51, p. 658–669, 2017b.

SCHNUCK, J. K. et al. Characterization of the metabolic effect of β -alanine on markers of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 20, n. 2, p. 34–41, 2016.

SMITH-RYAN, A. E. et al. High-Velocity Intermittent Running: effects of beta-alanine supplementation. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 26, n. 10, p. 2798–2805, 2012.

SMITH, A. E. et al. Effects of β -alanine supplementation and high-intensity interval training on endurance performance and body composition in men; a double-blind trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 5, 2009a.

SMITH, A. E. et al. The effects of beta-alanine supplementation and high-intensity interval training on neuromuscular fatigue and muscle function. **European Journal of Applied Physiology**, v. 105, n. 3, p. 357–363, 2009b.

SMITH, B. The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. **Journal of Physiology**, v. 92, p. 336–343, 1938.

SPRIET, L. L. et al. Muscle glycogenolysis and H^+ concentration during maximal intermittent cycling. **Journal of Applied Physiology**, v. 66, n. 1, p. 8–13, 1989.

STEGEN, S. et al. Meal and Beta-Alanine Coingestion Enhances Muscle Carnosine Loading. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 45, n. 8, p. 1478–1485, 2013.

STELLINGWERFF, T. et al. Effect of two beta-alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout. **Amino Acids**, v. 42, p. 2461–2472, 2012.

STÖGGL, T. L.; BJÖRKLUND, G. High intensity interval training leads to greater improvements in acute heart rate recovery and anaerobic power as high volume low intensity training. **Frontiers**

in **Physiology**, v. 8, n. August, p. 1–8, 2017.

SWEENEY, K. M. et al. The effect of beta-alanine supplementation on power performance during repeated sprint activity. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 24, n. 1, p. 79–87, 2010.

TOBIAS, G. et al. Additive effects of beta-alanine and sodium bicarbonate on upper-body intermittent performance. **Amino Acids**, v. 45, n. 2, p. 309–317, 2013.

TOMAZIN, K.; MORIN, J. B.; MILLET, G. Y. Etiology of neuromuscular fatigue after repeated sprints depends on exercise modality. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 12, n. 7, p. 878–885, 2017.

TOMLIN, D. L.; WENGER, H. A. The relationship between aerobic fitness and recovery from high intensity intermittent exercise. **Sports Medicine**, v. 31, n. 1, p. 1–11, 2001.

TREXLER, E. T. et al. International society of sports nutrition position stand: Beta-Alanine. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 30, 2015.

TRIVEDI, B.; DANFORTH, W. H. Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. **The journal of biological chemistry**, v. 241, n. 17, p. 4110–4113, 1966.

VAN THIENEN, R. et al. β -Alanine improves sprint performance in endurance cycling. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 4, p. 898–903, 2009.

VAN THIENEN, R. et al. Twin resemblance in muscle HIF-1 α responses to hypoxia and exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–11, 2017.

WALTER, A. S. et al. Six weeks of high-intensity interval training with and without beta-alanine supplementation for improving cardiovascular fitness in women. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 24, n. 5, p. 1199–1207, 2010.

WESTERBLAD, H. Acidosis is not a significant cause of skeletal muscle fatigue. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 48, n. 11, p. 2339–2342, 2016.

WESTERBLAD, H.; ALLEN, D. G.; LÄNNERGREN, J. Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? **News Physiol Sci.**, v. 17, n. 1, p. 17–21, 2002.

WESTON, A. R. et al. Skeletal muscle buffering capacity and endurance performance after high-intensity interval training by well-trained cyclists. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 75, n. 1, p. 7–13, 1997.

ZAGATTO, A. M. et al. MAOD determined in a single supramaximal test: A study on the reliability and effects of supramaximal intensities. **International Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 9, p. 700–707, 2016.

ZAGATTO, A. M.; BECK, W. R.; GOBATTO, C. A. Validity of the running anaerobic sprint test for assessing anaerobic power and predicting short-distance performances. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 23, n. 6, p. 1820–1927, 2009.

ZOELLER, R. F. et al. Effects of 28 days of beta-alanine and creatine monohydrate supplementation on aerobic power, ventilatory and lactate thresholds, and time to exhaustion. **Amino Acids**, v. 33, n. 3, p. 505–510, 2007.

ANEXO I

FACULDADE DE CIÊNCIAS
CAMPUS DE BAURU/ UNESP -
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Influência da suplementação de beta-alanina associado ao treinamento intervalado de alta intensidade no desempenho de sprints repetidos

Pesquisador: Fabio Milioni

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40940914.4.0000.5398

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.461.011

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa experimental testando os efeitos do suplemento alimentar Alanina na performance em treinamento intervalado de alta intensidade.

Objetivo da Pesquisa:

Testar os efeitos do suplemento Alanina na performance em treinamento intervalado de alta intensidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos dizem respeito à realização de atividade física de alta intensidade e foram previstos, assim como os meios de proteção e eventuais cuidados paliativos. Os benefícios dizem respeito a um maior conhecimento sobre o uso de suplementos que utilizem a substância em teste

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de investigação experimental bem fundamentada conceitualmente e com metodologia adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está bem elaborado e respeita os direitos dos participantes.

Recomendações:

nada a declarar

Endereço: Av. Luiz Edmundo Carrijo Coube, nº 14-01
Bairro: CENTRO **CEP:** 17.033-360
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3103-6087 **Fax:** (14)3103-6087 **E-mail:** arimaia@fc.unesp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
CAMPUS DE BAURU/ UNESP -
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 1.461.011

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nada a declarar

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo apresenta boa fundamentação teórica e metodologia adequada. A avaliação dos riscos e benefícios foi realizada corretamente e os termos de apresentação obrigatória estão elaborados em linguagem adequada, respeitando os direitos dos participantes da pesquisa. Recomenda-se a aprovação do protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_664255E1.pdf	16/02/2016 16:43:39		Aceito
Outros	Justificativa_alteracao.pdf	16/02/2016 16:40:17	Fabio Milioni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Doc_novo.pdf	16/02/2016 16:38:39	Fabio Milioni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Doutorado_Novo.pdf	16/02/2016 15:57:08	Fabio Milioni	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	09/12/2014 17:39:51		Aceito
Outros	Questionário Triagem Biópsia.doc	08/12/2014 17:25:51		Aceito
Outros	Carta de anuência_médico.pdf	08/12/2014 17:25:18		Aceito
Outros	Carta de anuência_local.pdf	08/12/2014 17:24:53		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Luiz Edmundo Carrijo Coube, nº 14-01

Bairro: CENTRO

CEP: 17.033-360

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3103-6087

Fax: (14)3103-6087

E-mail: arimaia@fc.unesp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
CAMPUS DE BAURU/ UNESP -
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 1.461.011

BAURU, 22 de Março de 2016

Assinado por:
Ari Fernando Maia
(Coordenador)

Endereço: Av. Luiz Edmundo Carrijo Coube, nº 14-01
Bairro: CENTRO **CEP:** 17.033-360
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3103-6087 **Fax:** (14)3103-6087 **E-mail:** arimaia@fc.unesp.br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12).

O Sr. está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Influência da suplementação de beta-alanina associado ao treinamento intervalado de alta intensidade no desempenho de sprints repetidos” que tem como responsável o pesquisador FABIO MILIONI, Doutorando na área de Educação Física, orientado/supervisionado pelo Prof. Dr. Alessandro Moura Zagatto. O projeto tem como objetivo investigar o efeito da suplementação do aminoácido beta-alanina associado ao treinamento físico no desempenho esportivo. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável em caso de qualquer dúvida.

Os requisitos para participar do estudo é ser fisicamente ativo, não fazer uso regular de bebidas alcoólicas e/ou tabagismo, não estar fazendo uso de suplementos alimentares proteicos, especialmente creatina e não apresentar problemas de saúde como insuficiências cardiorrespiratórias ou limitações músculo-esqueléticas. A pesquisa será constituída de 2 fases: 1ª fase – Treinamento físico, 2ª fase - Treinamento físico associado à suplementação.

Antes do início da primeira fase, ao final da primeira fase e antes do início da segunda fase e ao final do estudo (segunda fase), serão realizadas as avaliações físicas que serão compostas por 3 dias de testes. No primeiro dia o Sr. irá realizar um teste na esteira ergométrica no qual a cada dois minutos a velocidade irá aumentar 1 km/h até o momento que o Sr. não conseguir mais correr. O segundo dia de avaliação irá ocorrer, ao menos, 48 h após o primeiro e o Sr. irá realizar duas séries de 6 corridas de 35 metros de distância na máxima velocidade que o Sr. conseguir em uma pista de corrida, sendo que será permitido um descanso de 10 segundos entre as corridas e um descanso de 4 minutos entre as séries. O terceiro dia de avaliação irá ocorrer, ao menos, 48 h após o segundo e o Sr. irá realizar um teste em esteira ergométrica no qual a velocidade permanecerá constante em uma velocidade alta e de acordo com os resultados encontrados no primeiro dia de testes, e a corrida deverá ser sustentada pelo maior tempo que conseguir.

Os testes do primeiro e terceiro dias de avaliação serão realizados juntamente com o uso de equipamento que mede os gases da respiração (ergoespirometria), e ao final desses testes será realizada uma punção do lóbulo da orelha com uma pequena lamina estéril e descartável para coleta de quantidade mínima de sangue (aproximadamente 1 gota). Ambos os procedimentos são rotineiros no laboratório, porém podem gerar um ligeiro desconforto para pessoas não familiarizadas. Também

nesses dias, previamente e imediatamente após as corridas o Sr. irá realizar contrações máximas do músculo da coxa, sendo que durante as contrações serão aplicados impulsos elétricos no nervo da coxa por um aparelho produzido especificamente para isso. A intensidade dos impulsos elétricos irá até o limite do seu desconforto, e o impulso elétrico será aplicado por eletrodos sobre a pele. Ao mesmo tempo será monitorada a atividade elétrica (eletromiografia) produzida pelo músculo utilizando aparelho específico e eletrodos posicionados na pele após raspagem dos pêlos e assepsia do local com material estéril, descartável e de uso único.

A primeira fase terá duração de 4 semanas, nas quais o Sr. irá realizar treinamento de corrida na esteira de duas a três vezes na semana. O treinamento será composto por 10 corridas de 1 minuto com 1 minuto de intervalo em velocidade relativa ao resultado das suas avaliações prévias. A segunda fase terá duração de seis semanas e o mesmo programa de treinamento descrito anteriormente será associado a suplementação de beta-alanina ou substância placebo (carboidrato dextrose), sendo que nem o pesquisador responsável nem o Sr. saberão qual é a substância. A dosagem administrada será 6,4 g, sempre em cápsulas de 800 mg que **DEVERÃO** ser ingeridas juntamente com as refeições (café-da-manhã, almoço, lanche da tarde, janta e outros) e com no mínimo 2 horas de intervalo entre elas para evitar que uma superdosagem leve à parestesia, que é uma pequena alteração momentânea da sensação na pele, com ligeiros formigamentos, frio e calor.

Previamente a segunda etapa e ao final da segunda etapa será realizada a biópsia muscular que é uma técnica laboratorial e não cirúrgica, e será realizada por um médico competente (Dr. Paulo de Tarso Guerrero Müller – CRM-MS 79002370), que irá utilizar materiais estéreis. Nesse procedimento será aplicado abaixo da pele um anestésico local (lidocaína) e após a anestesia será feita uma pequena incisão de aproximadamente 0,5 cm na parte lateral da perna, para que seja possível inserir uma agulha específica (agulha de Bergstrom) e a retirada de uma pequena quantidade de músculo (aproximadamente 100 miligramas). Em seguida será feito um pequeno curativo com esparadrapo estéril específico e compressão do local com bandagem durante 24h, não havendo a necessidade de ponto cirúrgico (sutura). Nesse procedimento, são raríssimos os casos de complicações como infecções ou queloide, e há somente sensação de desconforto no momento do procedimento, sendo bastante incomum a ocorrência de dor e sangramento abundante. O local da biópsia pode ficar sensível ou dolorido durante 24 – 48h e podem ocorrer hematomas e pequenos sangramentos durante esse período. Ainda, você deverá responder um questionário específico (em anexo), para que seja certificado que você não possui reação adversa

ao anestésico a ser utilizado ou mesmo sobre o processo de cicatrização. Certifique-se de discutir todas as suas dúvidas com o médico.

São benefícios da participação no estudo, a possibilidade de realizar um teste para verificar sua capacidade pulmonar e cardíaca, obter índices para prescrição de exercício individualizada que poderá contribuir para a melhora da sua condição cardiopulmonar e condicionamento físico. Além disso, poderá conhecer sua capacidade de exercício em corrida, treinar de forma orientada durante o período da pesquisa e conhecer as adaptações físicas após o treinamento. Você será notificado dos aspectos mais importantes do estudo após sua conclusão e poderá inteirar-se do estado geral de sua saúde e condição física.

É importante deixar claro que o Sr. tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o Sr.. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do pesquisador do projeto e sobre seus direitos aos representantes do Comitê de Ética. A participação nesta pesquisa não traz complicações legais e os riscos e desconfortos são os mesmos que uma pessoa que pratica atividade física teria, tais como leve mal estar decorrente do esforço, arritmias cardíacas leves e desconfortos musculares durante a pesquisa e em dias seguintes (dor tardia). Entretanto, todos os procedimentos serão acompanhados por profissionais, que no caso de alguma ocorrência estarão aptos à execução de técnicas de socorros urgência e transporte para unidade de socorro mais próxima.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais sendo que somente o pesquisador e o orientador terão conhecimento dos dados. Todo material biológico coletado (sangue e tecido) será utilizado exclusivamente para a presente pesquisa e então devidamente descartado em local apropriado e inutilizado a partir de incineração por empresa especializada prestadora de serviços para UNESP/Bauru, de forma que **NÃO** será integrado a um banco de material biológico e **NÃO** será utilizado para outro fim.

Após estes esclarecimentos, convido-o a participar dessa pesquisa e solicito o seu consentimento de forma livre para participar da mesma, assinando este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que será elaborado em duas vias, as quais uma ficará de posse do pesquisador responsável e a outra em sua posse.

Título do Projeto: Influência da suplementação de beta-alanina associado ao treinamento intervalado de alta intensidade no desempenho de sprints repetidos.

Pesquisador Responsável: Fabio Milioni. Cargo/Função: Doutorando. Instituição: Departamento de Educação Física - Instituto de Biociências – UNESP – Rio Claro, Av. 24 A 1515 – Bela Vista - Telefone: (11) 96604 0713. E-mail: fmilioni@yahoo.com.br

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Moura Zagatto

Instituição: Departamento de Educação Física – Faculdade de Ciências UNESP - Bauru, Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01 – Vargem Limpa - Telefone: (14) 3103-6082 / ramal: 7991. E-mail: azagatto@yahoo.com.br

Dados do participante da pesquisa:

Nome: _____

RG: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

E-mail: _____

Telefone: (____) _____

Bauru, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do participante

Prof. Dr. Alessandro Moura Zagatto
Orientador

Fabio Milioni
Pesquisador Responsável