

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
DOUTORADO EM BASES EXPERIMENTAIS DA NUTRIÇÃO

VICTOR AMORIM FARIAS ANDRADE DE SOUZA

**RESPOSTAS AGUDAS AO EXERCÍCIO COM CONTEÚDO
DE GLICOGÊNIO MUSCULAR REDUZIDO**

RECIFE - 2018

VICTOR AMORIM FARIAS ANDRADE DE SOUZA

**RESPOSTAS AGUDAS AO EXERCÍCIO COM CONTEÚDO
DE GLICOGÊNIO MUSCULAR REDUZIDO**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Nutrição
– Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do
título de Doutor em Nutrição,
área de concentração Bases
Experimentais da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Carol Virgínia Góis Leandro

RECIFE - 2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S729r Souza, Victor Amorim Farias Andrade de.
Respostas agudas ao exercício com conteúdo de glicogênio muscular
reduzido / Victor Amorim Farias Andrade de Souza.– 2018.
80 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Adriano Eduardo Lima da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Biogênese de organelas. 2. Expressão gênica. 3. Treinamento
intervalado de alta intensidade. I. Silva, Adriano Eduardo Lima da
(Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-192)

VICTOR AMORIM FARIAS ANDRADE DE SOUZA

**RESPOSTAS AGUDAS AO EXERCÍCIO COM CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO
MUSCULAR REDUZIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição. Área de concentração Bases Experimentais da Nutrição.

Tese aprovada em 27 de fevereiro de 2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima-Silva
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof^a. Dr^a. Thays de Ataíde e Silva
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Fernando Roberto de Oliveira
Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Kleiton Augusto Santos Silva
University of Missouri

Prof^a. Dr^a. Raquel da Silva Aragão
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE - 2018

À minha esposa e ao meu filho, minhas fortalezas. Sem eles, meus sonhos seriam inalcançáveis.

AGRADECIMENTOS

À Deus, causa primária do Universo que me deu força para superar cada dificuldade e me trouxe luz e amor nos momentos mais maravilhosos da minha vida. Gratidão por sua presença em minha alma.

Aos meus pais, avós e irmãos. Família é a base sólida em que construo minha morada. A família é a nossa maior oportunidade de aprender sobre o amor, o respeito, a fé, o perdão e a vida. Gratidão por tudo.

À minha esposa, Myllena, por estar ao meu lado em todos os momentos. Cada batalha, cada luta, cada momento de alegria, eu olhava para o lado e lá estava você. Sempre disposta a me ajudar. Teu sorriso é minha maior felicidade. Gratidão por todo o nosso amor.

Ao meu filho, Noah. Teu nascimento me transformou, me fez renascer. Que eu possa te ensinar pelo exemplo e pelo amor sempre. Gratidão por essa oportunidade de ser teu pai nesta existência.

Ao meu orientador, Prof. Adriano Lima-Silva por permitir o meu crescimento profissional e pessoal. Mais que um orientador, ganhei um amigo, um irmão mais velho, sempre disposto a me aconselhar sobre o melhor caminho a seguir. Gratidão por estimular meu crescimento, por acreditar no meu trabalho e pelas oportunidades que o senhor me proporcionou.

À minha orientadora, Prof^a Carol Leandro pela oportunidade de poder entrar no Programa de Pós-Graduação sob a sua supervisão. Seu exemplo serve de inspiração para o meu crescimento. Gratidão.

Ao meu orientador externo, Prof. David Bishop por me receber tão bem em seu laboratório e grupo de pesquisa. Seus conselhos e conversas ficarão em minha memória para sempre. Thank you David.

Aos meus amigos do GPCE. Thaysa, Thays, Rafa, Kleiton, Marcos, Guilherme, Leo, Fabiano, Ana, Sara, Rodrigo e Luciana por compartilharem conhecimento. Ciência não se faz sozinho. Gratidão pelo apoio de vocês.

Aos colaboradores científicos no Brasil e na Austrália. Prof. João Henrique, Prof^a. Mariana, Prof^a. Raquel, Prof. Gustavo, Prof. Rômulo, Jujiao Kuang, Nicholas Saner, Jackson Fyfe, Cesare Granata, Amanda Sanders, Felipe Falcão-Tebas e Evelyn Marin. Gratidão por toda paciência e incentivo.

Aos meus amigos da Pós-graduação que compartilharam momentos e conversas maravilhosas durante esses quatro anos de formação. Gratidão.

Aos meus amigos que a vida me trouxe por me incentivarem mesmo, muitas vezes, não sabendo ou não entendendo a importância das minhas ausências. Gratidão.

À Pós-graduação, Cecília, Neci e Professora Elizabeth por todo incentivo e auxílio nestes quatro anos. Gratidão.

Ao CNPQ, FACEPE e ao PROEX CAPES 1734-2015, por financiarem meus experimentos. Obrigado.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar se a elevada sinalização induzida pelo exercício realizado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular pode ser atribuída ao baixo conteúdo de glicogênio muscular por si ou pela realização de duas sessões de exercício com demasiada proximidade. Neste cenário, dois diferentes regimes de exercício, manipulando a duração da recuperação entre o primeiro e segundo exercício (isto é, treinar duas vezes no mesmo dia *versus* treinar diariamente), foram desenhados no presente estudo. Outra condição experimental composta somente por um exercício foi realizada como controle (isto é, sem qualquer possível influência do exercício prévio e do reduzido conteúdo de glicogênio muscular). A hipótese do presente estudo é que a metodologia treinar duas vezes no mesmo dia potencializará a transcrição de genes relacionados à biogênese mitocondrial em comparação com a metodologia treinar diariamente. No ensaio treinar diariamente, os participantes realizaram o exercício para depleção do glicogênio muscular na noite anterior e no início da tarde do dia seguinte realizaram a sessão de exercício intervalado de alta intensidade (EIAI). Na manhã do ensaio treinar duas vezes no mesmo dia, os participantes realizaram o exercício para depleção do glicogênio muscular seguido duas horas depois pela sessão EIAI no início da tarde. Durante o ensaio controle, os participantes realizaram somente a sessão EIAI no início da tarde. Biópsias do músculo vasto lateral e amostras de sangue venoso foram coletadas antes, imediatamente após e 3h após a realização das sessões EIAI. Antes da sessão EIAI, a concentração de glicogênio muscular foi similar nas condições treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente ($p > 0,05$), mas ambas foram menores do que na condição controle ($p < 0,05$). A concentração muscular de glicogênio diminuiu após o EIAI nas três condições ($p < 0,05$), e manteve-se menor nas condições treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente em comparação com a condição controle 3h após EIAI ($p = 0,001$). O RNAm da PGC-1 α total e da isoforma 4 da PGC-1 α foram maiores na condição treinar duas vezes no mesmo dia comparado com as condições treinar diariamente e controle ($p < 0,05$). Além disso, o RNAm da PPAR α foi maior na condição treinar duas vezes no mesmo dia comparado as condições treinar diariamente e controle ($p < 0,05$). O RNAm da PPAR β/δ foi maior na condição treinar duas vezes no mesmo dia comparado a condição controle pós EIAI e maior quando comparado as condições treinar diariamente e controle 3h após EIAI ($p < 0,05$). Ademais, treinar duas vezes no mesmo dia aumentou a FC, $\dot{V}E$ e $\dot{V}O_2$ e diminuiu a glicose plasmática comparado as condições treinar diariamente e controle ($p < 0,05$). Portanto, evidências indicam que a realização de duas sessões de exercício com demasiada proximidade potencializa a transcrição gênica da PGC-1 α , PPAR α e PPAR β/δ , de forma independente dos níveis iniciais de glicogênio muscular. Esses resultados sugerem que treinar duas vezes no mesmo dia talvez seja uma estratégia mais eficiente para induzir adaptações relacionadas a biogênese mitocondrial, devido à realização de duas sessões de exercício com demasiada proximidade, do que propriamente pelo reduzido conteúdo de glicogênio muscular.

Palavras-chave: Biogênese de Organelas. Expressão gênica. Treinamento Intervalado de Alta Intensidade.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate whether the elevated exercise-induced gene signaling when exercise initiates with reduced muscle glycogen content can be attributed to low muscle glycogen content *per se* or due to performing two exercise sessions with close proximity. In this scenario, two different exercise regimens, manipulating recovery duration between the first and second exercise (i.e., training twice-a-day versus training once-daily), were designed in the present study. Another experimental condition composed for only one exercise was performed as a control (i.e., without any possible influence of previous exercise and reduced muscle glycogen content). The hypothesis of the present study is that the twice-a-day methodology will potentiate the transcription of genes related to mitochondrial biogenesis in comparison to the once-daily methodology. In the once-daily trial, participants performed muscle glycogen depletion exercise the evening before and at the beginning of afternoon of the following day performed the high intensity interval exercise (HIIE). On the morning of the twice-a-day trial, participants performed the muscle glycogen depletion exercise followed two hours later by the HIIE session at the beginning of afternoon. During the control trial, participants performed only the HIIE session at the beginning of afternoon. *Vastus lateralis* muscle biopsies and venous blood samples were collected before, immediately after and 3 hours after the HIIE sessions. Before the HIIE session, muscle glycogen concentration was similar between twice-a-day and once-daily conditions ($p > 0.05$), but both were lower than in the control condition ($p < 0.05$). The muscle glycogen concentration decreased after the HIIE in the three conditions ($p < 0.05$), and it was maintained lower in the twice-a-day and once-daily conditions compared to the control condition 3h after HIIE ($p = 0.001$). The total PGC-1 α and PGC-1 α isoform 4 mRNAs were higher in the twice-a-day condition compared to the once-daily and control conditions ($p < 0.05$). In addition, the mRNA of PPAR α was higher in the twice-a-day condition compared to the once-daily and control conditions ($p < 0.05$). The PPAR β/δ mRNA was higher in the twice-a-day condition compared to the control condition post HIIE and higher when compared to both the once-daily and control conditions 3 h post HIIE ($p < 0.05$). Training twice-a-day increased HR, $\dot{V}E$ and $\dot{V}O_2$ and decreased plasma glucose compared to both once-daily and control conditions ($p < 0.05$). Therefore, evidence indicates that performing two sessions of exercise with so much proximity potentiates the transcription of PGC-1 α , PPAR α and PPAR β/δ mRNAs, independently of the initial levels of muscle glycogen. These results suggest that training twice-a-day may be a more efficient strategy to induce adaptations related to mitochondrial biogenesis due to two exercise sessions closer, rather than due to reduced muscle glycogen content.

Key words: Organelle biogenesis. Gene expression. High-Intensity Interval Training.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho experimental.....	23
Figura 2: Concentração de glicogênio muscular pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI).....	31
Figura 3: Genes mitocondriais pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI).....	33
Figura 4: Expressão dos genes relacionados com o transporte de lipídios e lipólise pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI).....	35
Figura 5: Expressão dos genes relacionados a oxidação de carboidratos e mitofagia pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI).....	37
Figura 6: Respostas fisiológicas e sistêmicas durante o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Detalhes dos primers usados para RT-qPCR.....29

Tabela 2: Concentrações plasmáticas de lactato, glicose, epinefrina and norepinefrina, e concentração sérica de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI).....39

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3 HIPÓTESE.....	19
4 OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo geral.....	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5 MÉTODOS.....	21
5.1 Participantes.....	21
5.2 Delineamento experimental.....	21
5.3 Protocolos de exercício.....	24
5.3.1 Teste incremental.....	24
5.3.2 Exercício de depleção do glicogênio muscular.....	24
5.3.3 Sessão de exercício intervalado de alta intensidade.....	25
5.4 Dieta e exercício padronizados antes dos ensaios experimentais.....	25
5.5 Coleta e análise sanguínea.....	25
5.6 Coleta e análise do tecido muscular.....	26
5.7 Conteúdo de glicogênio muscular.....	27
5.8 Real-Time PCR.....	27
5.8.1 Extração de RNA total.....	27
5.8.2 Transcrição reversa.....	27
5.8.3 qPCR.....	28
5.9 Análise estatística.....	30
6 RESULTADOS.....	31
6.1 Concentração de glicogênio muscular.....	31
6.2 A expressão de genes nucleares e mitocondriais durante o EIAI.....	32
6.3 A expressão de genes relacionados ao transporte de lipídios e a lipólise durante o EIAI.....	34
6.4 A expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e atividade do lisossomo durante EIAI.....	36
6.5 Respostas fisiológicas durante o EIAI.....	36

7	DISCUSSÃO.....	40
8	APLICAÇÕES PRÁTICAS.....	46
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICES.....	58
	APÊNDICE A - Capítulo de livro intitulado Treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular. In: Aptidão aeróbia: desempenho esportivo, saúde e nutrição.1 ed. Barueri: Manole, 2017, v.1, p. 461-476. ISBN 978-85-204-5035-2.....	58
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	74
	ANEXOS.....	78
	ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE).....	78

1 INTRODUÇÃO

O treinamento de *endurance* induz a diversas adaptações que levam ao aumento do desempenho, tais como o aumento do consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_{2max}$) e o prolongamento do tempo de exaustão para uma determinada carga de trabalho, sendo essas adaptações relacionadas parcialmente a fatores dentro do músculo (SALTIN e ROWELL, 1980). As adaptações do treinamento que permitem o aumento do desempenho, também incluem aumento no número de capilares (ANDERSEN e HENRIKSSON, 1977a), aumento do volume e densidade mitocondrial com a elevação da atividade de enzima como a 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HAD) e citrato sintase (CS) (GOLLNICK e SALTIN, 1982; HARGREAVES, 2000), aumento na concentração de proteínas transportadoras (HOLLOSZY e BOOTH, 1976) e aumento da ocorrência de fibras do tipo IIA em decorrência das fibras do tipo IIX (ANDERSEN e HENRIKSSON, 1977b). Consequentemente, a habilidade de metabolizar predominantemente gordura é aumentada (GOLLNICK e SALTIN, 1982), o que pouparia glicogênio muscular para uma mesma carga de trabalho absoluta. Em nível molecular, pensa-se que as adaptações crônicas ao treinamento sejam o resultado dos efeitos cumulativos de mudanças transitórias na transcrição de vários genes após cada sessão aguda de exercício (PILEGAARD *et al.*, 2000; HANSEN *et al.*, 2005; HULSTON *et al.*, 2010; PERRY *et al.*, 2010; BARTLETT *et al.*, 2013). Uma única sessão de exercício ativa a transcrição de genes mitocondriais e metabólicos que promovem as adaptações ao treinamento (PILEGAARD *et al.*, 2000; PERRY *et al.*, 2010).

Algumas evidências, entretanto, indicam que iniciar uma sessão de exercício de *endurance* com reduzido conteúdo de glicogênio muscular afeta algumas dessas adaptações ao treinamento (BAAR e MCGEE, 2008; HAWLEY e BURKE, 2010; HAWLEY e MORTON, 2014; BARTLETT *et al.*, 2015; KNUIMAN *et al.*, 2015). De fato, estudos recentes tem demonstrado que quando comparado com iniciar todas as sessões de treinamento com estoques normais de glicogênio muscular, reduzir o conteúdo de glicogênio muscular antes de pelo menos metade das sessões do ciclo de treinamento resulta em maiores adaptações na oxidação de gordura corporal (YEO *et al.*, 2008; HULSTON *et al.*, 2010), na atividade máxima de enzimas mitocondriais

(HANSEN *et al.*, 2005; YEO *et al.*, 2008; HULSTON *et al.*, 2010) e no desempenho (HANSEN *et al.*, 2005; COCHRAN *et al.*, 2015; MARQUET *et al.*, 2016). Além disso, o aumento na transcrição do gene PGC-1 α , o principal regulador biogênese mitocondrial (VEGA *et al.*, 2000), assim como de outros genes relacionados ao metabolismo aeróbio, como PDK4, UCP3, COX IV e Tfam induzidos pelo exercício foram mais elevados quando o conteúdo de glicogênio muscular foi reduzido antes do exercício (PILEGAARD *et al.*, 2002; BARTLETT *et al.*, 2013; PSILANDER *et al.*, 2013). Adicionalmente, o exercício com reduzido conteúdo de glicogênio muscular poderia afetar outros fatores de transcrições relacionados a vias alternativas que também regulariam a biogênese mitocondrial, dentre eles o gene da proteína p53 e dos receptores ativados pelo proliferador de peroxissomos (PPARs). Entretanto, nenhum estudo buscou avaliar a expressão gênica da p53 após a realização do exercício com reduzido conteúdo de glicogênio muscular. Por outro lado, a realização de exercício com baixo conteúdo de glicogênio muscular não afetou a transcrição PPAR β/δ (PSILANDER *et al.*, 2013). Essa elevação na transcrição de genes nucleares e mitocondriais quando repetida sistematicamente em diversas sessões de treinos com reduzido conteúdo de glicogênio muscular poderia resultar em elevada biogênese mitocondrial (HOOD *et al.*, 2016).

Contudo, o mecanismo preciso pelo qual o reduzido conteúdo glicogênio muscular promove melhores adaptações moleculares ao treinamento e, se o reduzido conteúdo de glicogênio muscular por si é realmente o responsável por essas adaptações é atualmente desconhecido. Por exemplo, em diversos estudos, o conteúdo de glicogênio muscular foi reduzido por meio de uma primeira sessão de exercício noturna seguida por uma dieta com baixo teor de carboidratos (CHO)/alto lipídios ou uma privação alimentar após o exercício, dormindo posteriormente com baixa disponibilidade de CHO e, uma segunda sessão de exercício (por exemplo, exercício intervalado de alta intensidade, EIAI) realizado no dia seguinte, a chamada metodologia “treinar diariamente” (PILEGAARD *et al.*, 2002; BARTLETT *et al.*, 2013; PSILANDER *et al.*, 2013; LANE *et al.*, 2015; MARQUET *et al.*, 2016). Em outros, no entanto, o conteúdo de glicogênio muscular foi reduzido por meio de uma primeira sessão de exercício pela manhã e, uma a três horas mais tarde, realizou-se uma segunda sessão de exercício, a chamada metodologia “treinar duas vezes no mesmo dia” (HANSEN *et al.*, 2005; YEO *et al.*, 2008; COCHRAN *et al.*, 2010; HULSTON *et*

al., 2010; YEO *et al.*, 2010; COCHRAN *et al.*, 2015). Embora a segunda sessão de treinamento comece com baixo conteúdo de glicogênio muscular em ambas as metodologias (PILEGAARD *et al.*, 2002; YEO *et al.*, 2010), não é conhecido se ambas reduzem os níveis de glicogênio muscular à valores absolutos similares, sendo possível que as adaptações ao treinamento nesta última abordagem possam estar relacionadas, em parte, a duas sessões de exercício realizadas no mesmo dia e tão próximo, e não exclusivamente ao reduzido conteúdo de glicogênio muscular. Dessa forma, a primeira sessão, quando realizada muito próxima à segunda, poderia induzir a uma ativação aumentada da transcrição de genes metabólicos simplesmente porque os efeitos das duas sessões poderiam estar se somando. Entretanto, não há estudos comparando diretamente a ativação transcricional de genes associados a biogênese mitocondrial entre as duas metodologias.

Neste cenário, dois diferentes regimes de exercício, manipulando a duração da recuperação entre o primeiro e segundo exercício (isto é, treinar duas vezes no mesmo dia *versus* treinar diariamente) foi desenhada no presente estudo. Em ambas as metodologias, a primeira e a segunda sessões de exercício foram compostas por um exercício prolongado e um EIAI, respectivamente. Outra condição experimental composta só por um EIAI sem a primeira sessão para a depleção do glicogênio muscular foi realizada para isolar a possível influência do exercício prévio e do reduzido conteúdo de glicogênio muscular (controle).

Os resultados da presente investigação estão contidos em uma revisão narrativa e um artigo original. A revisão narrativa foi publicada como capítulo de livro, intitulado “Treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular”. In: Aptidão aeróbia: desempenho esportivo, saúde e nutrição. 1 ed. Barueri: Manole, 2017, v.1, p. 461-476. ISBN 978-85-204-5035-2. O artigo original será submetido à revista “*Nature Communications*”, ISSN 2041-1723 (online), Fator de Impacto (2016): 12.124, Qualis Nutrição 2013-2016: A1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Como mencionado, a revisão de literatura da presente tese resultou na publicação de um capítulo de livro intitulado *Treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular*. In: Aptidão aeróbia: desempenho esportivo, saúde e nutrição. 1 ed. Barueri: Manole, 2017, v.1, p. 461-476. ISBN 978-85-204-5035-2. (APÊNDICE A).

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que a metodologia treinar duas vezes no mesmo dia potencializará a transcrição de genes relacionados à biogênese mitocondrial em comparação com a metodologia treinar diariamente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi investigar se a elevada sinalização induzida pelo exercício realizado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular pode ser atribuída ao baixo conteúdo de glicogênio muscular por si ou pela realização de duas sessões de exercício com demasiada proximidade.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar as respostas agudas ao exercício intervalado de alta intensidade realizado por meio das metodologias treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente sobre:

- a transcrição de genes relacionados à biogênese mitocondrial;
- as respostas fisiológicas.

5 MÉTODOS

5.1 Participantes

Oito homens saudáveis, fisicamente ativos, que não eram atletas, mas acostumados a pedalar ($30,8 \pm 3,5$ anos, $78,7 \pm 9,9$ kg, $1,76 \pm 0,07$ m, $13,6 \pm 5,1\%$ de gordura corporal), participaram deste estudo. Os participantes foram informados acerca dos procedimentos, riscos e benefícios associados ao protocolo antes de assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido para participar deste estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 30378414.8.0000.5208).

5.2 Delineamento experimental

Cada participante completou três ensaios experimentais, usando um delineamento *crossover* randomizado obtido através de um programa de randomização (software disponível em <http://www.randomized.org>). Uma visão geral do delineamento experimental é mostrada na Figura 1. Brevemente, no ensaio treinar diariamente, os participantes realizaram o exercício para depleção do glicogênio muscular na noite anterior (20:00 – 22:00) seguidos por um jejum noturno. Na manhã seguinte (08:00), os participantes ingeriram um café da manhã com baixo conteúdo de CHO (CHO: 7%; lipídeos: 60%; proteínas: 33%) e realizaram a sessão EIAI no início da tarde (13:00). Na manhã do ensaio treinar duas vezes no mesmo dia (08:00), os participantes tomaram um café da manhã com baixo conteúdo de CHO e então realizaram o exercício para depleção do glicogênio muscular (09:00-11:00) seguido duas horas depois pela sessão EIAI (13:00). Durante o ensaio controle, os participantes tomaram o café da manhã com baixo conteúdo de CHO (08:00) e então realizaram a sessão EIAI (13:00).

Durante o intervalo entre os exercícios os participantes descansaram no laboratório e beberam água *ad libitum*. Biópsias do músculo vasto lateral da mesma perna e amostras de sangue venoso foram coletadas antes, imediatamente após e 3h após a realização das sessões EIAI. Cada ensaio experimental foi separado por um

período de 1-2 semanas, com o intuito de eliminar efeitos residuais de fadiga ou danos causados pelas múltiplas biopsias musculares.

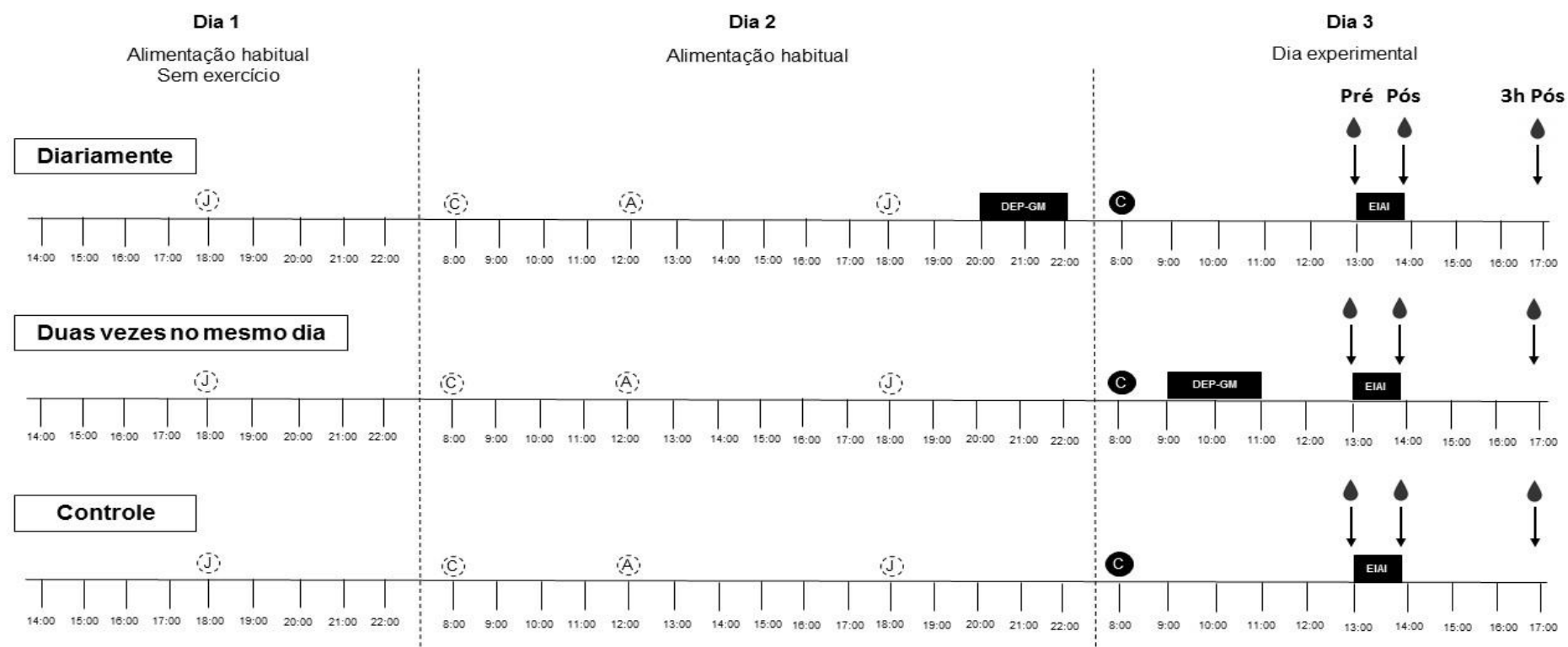


Figura 1. Desenho experimental. J, jantar; C, café da manhã; A, almoço; DEP-GM, exercício de depleção do glicogênio muscular; EIAI, exercício intervalado de alta intensidade; setas escuras: indicam a realização das biópsias musculares; gotículas pretas: indicam a realização das coletas de sangue venoso; círculos abertos, participantes replicaram sua alimentação habitual; círculos fechados, participantes ingeriram um café da manhã com baixo teor de carboidratos (CHO) [CHO: $42,7 \pm 5,0$ kcal (~ 7%); Lipídios: $365,9 \pm 43,1$ kcal (~ 60%); Proteínas: $201,3 \pm 23,7$ kcal (~ 33%)].

5.3 Protocolos de exercício

5.3.1 Teste incremental

Uma semana antes do início do estudo, os participantes realizaram um teste incremental até a exaustão em um cicloergômetro (Ergo-Fit 167, Pirmasens, Alemanha) que consistiu de estágios de 4 min de exercício, com 1 min de pausa passiva entre os estágios (EDGE *et al.*, 2006). O teste iniciou em 50 W, e a intensidade foi sendo aumentada em 25 W a cada estágio de 4 min até a exaustão voluntária a uma cadência de 70-80 rpm. O teste foi interrompido quando o participante não pode manter a requerida cadência (70 rpm). Encorajamento verbal foi provido a cada participante quando eles se encaminhavam ao final do teste.

O $\dot{V}O_2$ foi mensurado respiração-a-respiração durante todo o teste por um analisador automático (Cortex, Metalyzer 3B®, Saxony, Alemanha). Antes de cada teste, o analisador foi calibrado usando o ar ambiente e um cilindro de gases com concentrações conhecidas (12% O_2 e 5% CO_2). O volume do analisador foi calibrado usando uma seringa de 3 litros (Cortex®, Saxony, Alemanha). Amostras de sangue capilar do lóbulo da orelha foram coletadas antes do teste e imediatamente após cada estágio de 4 min do teste. O primeiro limiar de lactato (LL1) foi visualmente identificado por dois investigadores experientes como o primeiro aumento na concentração de lactato acima do nível de repouso (houve concordância entre os dois em 100% dos casos). O segundo limiar de lactato (LL2) foi calculado pelo método Dmax modificado (CHENG *et al.*, 1992; BISHOP *et al.*, 1998). O LL2 foi determinado pelo ponto na curva de regressão polinomial que produz a distância perpendicular máxima para a linha reta que liga o LL1 e o ponto de lactato final da curva de lactato coletado imediatamente após a exaustão. O $\dot{V}O_{2max}$ foi determinado como a média dos últimos 30 s do teste e a potência aeróbia máxima (PAM) foi determinada como a mais alta potência mecânica externa alcançada no teste. Se o participante não completou o último estágio de 4 min, então a fração completada de cada estágio foi adicionada a potência correspondente ao último estágio completo.

5.3.2 Exercício de depleção do glicogênio muscular

Para reduzir os estoques de glicogênio muscular, os participantes pedalaram por 100 min a uma potência externa correspondente a 50% da diferença entre LL1 e LL2 (124 ± 27 W, $54 \pm 5\%$ PAM). Após uma pausa passiva de 8 min, os participantes

realizaram 6 séries de 1 min a 125% PAM (287 ± 46 W) intercalados por períodos de 1 min de pausa passiva a uma cadência de 70-80 rpm (LIMA-SILVA *et al.*, 2013). Esse protocolo foi previamente validado por reduzir o conteúdo de glicogênio muscular (GOLLNICK *et al.*, 1974; HEIGENHAUSER *et al.*, 1983).

5.3.3 Sessão de exercício intervalado de alta intensidade

As sessões EIAI foram precedidas por 5 min de aquecimento a 90% LL1. Os participantes completaram 10 séries de 2 min de exercício a uma intensidade de 20% da diferença entre LL2 e PAM (182 ± 38 W, $79 \pm 5\%$ PAM) a uma cadência de 70-80 rpm. Cada série de exercício foi intercalada com 1 min de pausa passiva (EDGE *et al.*, 2006). Os participantes foram orientados a manter a frequência de pedalada entre 70-80 rpm durante cada série de exercício e descansar completamente durante os períodos de pausa passiva. $\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$, razão de trocas respiratórias (RER), e $\dot{V}E$ foram mensuradas respiração-a-respiração durante todo o exercício usando o mesmo analisador de gases, como descrito na sessão referente ao teste incremental. Os dados foram convertidos em intervalos de 30 s para análises. As amostras de tecido muscular foram coletadas em repouso (pré EIAI), imediatamente após EIAI (pós EIAI) e 3h após EIAI (3h pós EIAI). Adicionalmente, 15-20 ml de sangue venoso também foram coletados pré EIAI, pós EIAI e 3h pós EIAI.

5.4 Dieta e exercício padronizados antes dos ensaios experimentais

Os participantes foram orientados a registrar todos os alimentos e bebidas consumidos durante o período de 36-38h antes do início do exercício de depleção do glicogênio muscular do primeiro ensaio experimental e receberam instruções verbais e escritas sobre como repetir isto antes dos ensaios subsequentes. *Checklists* foram utilizados para registrar cada item à medida que foi consumido e para registrar quaisquer desvios da dieta estipulada. Não houveram alterações na alimentação habitual dos indivíduos durante o estudo. Os participantes também foram instruídos a evitar qualquer exercício extenuante, bem como o consumo de álcool e cafeína nas 24h antes de cada ensaio experimental.

5.5 Coleta e análise sanguínea

As amostras de sangue foram coletadas da veia antecubital e separadas em três tubos diferentes. O primeiro tubo continha fluoreto de sódio e EDTA e foram

recolhidos dois mililitros de sangue (HemogardTM Fluoride/EDTA, BD Vacutainer®, EUA). O sangue foi centrifugado a 4° C a 4000 rev·min⁻¹ durante 10 min com o plasma resultante transferido para tubos de 2 ml e imediatamente analisado quanto às concentrações plasmáticas de glicose e lactato. Foram coletados mais 8 ml de sangue em tubos contendo ativador de Clot e gel para separação de soro (SST II Plus, BD Vacutainer®, EUA) e outros 3 ml de sangue foram coletados em tubos contendo heparina de sódio (Sodium HeparineN Plus, BD Vacutainer®, EUA); ambos foram centrifugados a 4° C a 4000 rev·min⁻¹ durante 10 min e o plasma/soro resultante congelados e armazenados em nitrogênio líquido para posterior análise das concentrações plasmáticas de catecolaminas e concentrações séricas de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol.

As concentrações plasmáticas de glicose e lactato foram analisadas com um kit enzimático comercialmente disponível (Glicose Liquiform e Lactato Enzimático, respectivamente, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As concentrações plasmáticas de catecolaminas foram determinadas utilizando cromatografia líquida de fase reversa pareada ionicamente acoplada com detecção electroquímica (DI MARCO *et al.*, 2000; LIMA-SILVA *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2014). As concentrações séricas de AGL e de glicerol foram determinadas pelo método colorimétrico enzimático (EFFA-100 e EGLY-200, BioAssay, Hayward, Califórnia, EUA).

5.6 Coleta e análise do tecido muscular

Incisões no músculo vasto lateral foram realizadas com anestesia local (2% Xylestesin®) e amostras de tecido muscular (80-120 mg) foram coletadas usando a agulha de Bergström (BERGSTRÖM, 1962) adaptada para sucção manual (EVANS *et al.*, 1982). As amostras subsequentes foram coletadas à aproximadamente 1 cm de distância do local da biópsia anterior. As amostras foram imediatamente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até análises subsequentes. As biópsias foram subsequentemente analisadas quanto ao conteúdo de glicogênio muscular e à expressão de genes dos marcadores de adaptação ao treinamento (descritos posteriormente).

5.7 Conteúdo de glicogênio muscular

Aproximadamente 2-3 mg de tecido muscular liofilizados a seco foram pulverizados e dissecados manualmente de qualquer tecido não muscular visível. O tecido muscular em pó foi então extraído com 50 $\mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ de HCl 2M, incubados a 100°C durante 2 h (agitado suavemente a cada 20 min) e depois neutralizado com 150 $\mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ de NaOH 0,66 M. O conteúdo de glicogênio muscular foi subsequentemente analisado em triplicata por meio da análise enzimática com detecção fluorimétrica (HARRIS *et al.*, 1974). Os valores de glicogênio muscular foram expressos em milimoles por quilograma de peso seco.

5.8 Real-Time PCR

5.8.1 Extração de RNA total

O RNA total de aproximadamente 10-15 mg de músculo congelado foi homogeneizado em 800 μL de reagente TRIzol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) utilizando um TissueLyser II (Qiagen, Valencia, CA). Para aumentar o rendimento de RNA, foi utilizado 2-propanol e as amostras foram colocadas em freezer -20 °C durante a noite para precipitar o RNA. A pureza de cada amostra foi avaliada a partir da razão de absorção A260/A280 utilizando um BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). A concentração de RNA total também foi medida utilizando o BioPhotometer. A integridade de RNA de todas as amostras foi medida utilizando um sistema de eletroforese em gel microfluídico Bio-Rad Experion (7007104, kit Experion RNA StdSens Analysis) e determinado a partir do indicador de qualidade de RNA. O RNA total foi armazenado a -80 °C até que a transcrição reversa fosse realizada.

5.8.2 Transcrição reversa

1 μg de RNA, num volume total de reação de 20 μL , foi transcrita inversamente para cDNA utilizando um Thermocycler (S1000, Bio-Rad) e Bio-Rad iScript RT Supermix (170-8840) de acordo com as instruções do fabricante. O *priming* foi realizado a 25 °C durante 5 min e transcrição reversa durante 30 min a 42 °C. Todas as amostras, incluindo os controles negativos, foram executadas na mesma placa. O cDNA foi armazenado a -20 °C até a subsequente análise.

5.8.3 qPCR

A expressão relativa de mRNA foi medida por qPCR (QuantStudio 7 Flex, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Os *primers* foram desenhados utilizando Primer-BLAST (YE *et al.*, 2012) para incluir todas as variantes de emenda e foram adquiridos a Sigma-Aldrich (ver Tabela 1 para detalhes de *primers*). Todas as reações foram realizadas em duplicata em placas ópticas MicroAmp de 384 poços (4309849, Applied Biosystems) utilizando um sistema de pipetagem automatizado epMotion M5073 (Eppendorf AG), que permitiu analisar todas as amostras de dois genes numa mesma placa. O volume de reação total de 5 µl que continha 2 µl de cDNA diluído, 2,5 µl de mastermix e 0,5 µl de *primers* em concentrações de 5 µM ou 15 µM. Todos os ensaios decorreram durante 10 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 60 °C. A estabilidade de seis potenciais genes de referência foi determinada pelos softwares BestKeeper (PFAFFL *et al.*, 2004) e NormFinder (ANDERSEN *et al.*, 2004) e os três mais estáveis expressos foram TBP, 18S e ACTB (ver Tabela 1). Não houveram efeitos principais da condição, tempo ou efeito da interação, para os valores de Ct dos três genes de referência mais estáveis ($p > 0,05$). A expressão de cada gene alvo foi normalizada para a média geométrica dos três genes de referência (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) e utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (onde Ct é o ciclo de quantificação) (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

Tabela 1. Detalhes dos primers usados para RT-qPCR

Gene	Sequência Sense	Sequência Antisense
PGC-1 α	5'-CAGCCTCTTTGCCAGATCTT-3'	5'-TCACTGCACCACTTGAGTCCAC-3'
PGC-1 α 1	5'-ATGGAGTGACATCGAGTGTGCT-3'	5'-GAGTCCACCCAGAAAGCTGT-3'
PGC-1 α 4	5'-TCACACCAAACCCACAGAGA-3'	5'-TCACACCAAACCCACAGAGA-3'
COX IV	5'-GAGCAATTTCACCTCTGC-3'	5'-CAGGAGGCCTTCTCCTTCTC-3'
CPT1	5'-ACAGTCGGTGAGGCCTCTTA-3'	5'-CCACCAGTCGCTCACGTAAT-3'
NDUF	5'-TCAGATTGCTGTCAGACATGG-3'	5'-TGGTGTCCCTTCTATCTTCCA-3'
SDH	5'-AAATGTGGCCCCATGGTATTG-3'	5'-AGAGCCACAGATGCCTTCTCTG-3'
Cytochrome C	5'-GGGCCAAATCTCCATGGTCT-3'	5'-TCTCCCCAGATGATGCCTTT-3'
GLUT4	5'-CTTCATCATTGGCATGGGTTT-3'	5'-AGGACCGCAAATAGAAGGAAGA-3'
β -HAD	5'-TGGACAAGTTTGCTGCTGAACAT-3'	5'-TTTCATGACAGGCACTGGGT-3'
CD-36	5'-TTGATTGAAAAATCCTTCTTAGCCA-3'	5'-TGGTTTCTACAAGCTCTGGTTCTT-3'
PFK	5'-AAGACATCAAGAATCTGGTGGTTA-3'	5'-TCCAAAAGTGCCATCACTGC-3'
CS	5'-TGGGGTGCTGCTCCAGTATT-3'	5'-CCAGTACACCCAATGCTCGT-3'
PPAR α	5'-GGCAGAAGAGCCGTCTCTACTTA-3'	5'-TTTGCATGGTTCTGGGTACTGA-3'
PPAR γ	5'-CTTGTGAAGGATGCAAGGGT-3'	5'-GAGACATCCCCACTGCAAGG-3'
UCP3	5'-CCACAGCCTTCTACAAGGGATTTA-3'	5'-ACGAACATCACCACGTTCCA-3'
Tfam	5'-CCGAGGTGGTTTTTCATCTGT-3'	5'-GCATCTGGGTTCTGAGCTTT-3'
PDK4	5'-GCAGCTACTGGACTTTGGTT-3'	5'-GCGAGTCTCACAGGCAATTC-3'
p53	5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3'	5'-TTATGGCGGGAGGTAGACTG-3'
PPAR β/δ	5'-CATCATTCTGTGTGGAGACCG-3'	5'-AGAGGTACTGGGCATCAGGG-3'
TFEB	5'-CAGATGCCCAACACGCTACC-3'	5'-GCATCTGTGAGCTCTCGCTT-3'
CHCHD4	5'-GCTTGGCTGTTCTTGTATTTC-3'	5'-GTTTCCTCTCTTGCTGCTACTC-3'
p21	5'-GCAGACCAGCATGACAGATTT-3'	5'-GATGTAGAGCGGGCCTTTGA-3'
GAPDH	5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3'	5'-TGGACTCCACGACGTACTCA-3'
B2M	5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'	5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'
TBP	5'-CAGTGACCCAGCAGCATCACT-3'	5'-AGGCCAAGCCCTGAGCGTAA-3'
Cyclophilin	5'-GTCAACCCACCGTGTTCCTC-3'	5'-TTTCTGCTGTCTTTGGGACCTTG-3'
18S	5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'	5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'
ACTB	5'-GAGCACAGAGCCTCGCCTTT-3'	5'-TCATCATCCATGGTGAGCTGGC-3'

PGC- 1 α , peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α ; COX IV, cytochrome c oxidase subunit IV; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; NDUF, NADH:ubiquinone oxidoreductase; SDH, succinate dehydrogenase; GLUT4, glucose transporter type 4; β -HAD, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; CD36, fatty acid translocase cluster of differentiation 36; PFK, phosphofructokinase; CS, citrate synthase; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor delta; UCP3, uncoupling protein 3; Tfam, mitochondrial transcription factor A; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; p53, p53 protein; PPAR β/δ , peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta; TEFB, transcription elongation factor; CHCHD4, coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4; p21, p21 protein; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; B2M, β -2-microglobulin; TBP, TATA-box binding protein; 18S, 18S ribosomal RNA; ACTB, actin beta.

5.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism versão 6.01. Todas as variáveis foram analisadas quanto a sua esfericidade pelo teste de Mauchly's e normalidade pelo teste de Kolomogorov-Smirnov. Para comparar as respostas antes, após e 3h após cada sessão EIAI, os dados foram analisados pela ANOVA de medidas repetidas de dois caminhos (ensaio x tempo). Quando requerido, o teste *post-hoc* de Bonferroni foi utilizado para localizar as diferenças. Todos os valores foram expressos em médias $\pm$ DP. Significância foi aceita quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Concentração de glicogênio muscular

Pré EIAI, a concentração de glicogênio muscular foi menor nas condições treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente comparado com a condição controle ($p < 0,05$; Figura 2). A concentração de glicogênio muscular reduziu de forma semelhante pós EIAI nas três condições ($p < 0,05$), e manteve-se menor nas condições treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente em comparação com a condição controle 3h após EIAI ($p = 0,001$). A concentração de glicogênio muscular foi semelhante entre as condições treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente em qualquer ponto do tempo ($p = 0,99$).

Esse resultado demonstra que o exercício proposto para a depleção do glicogênio muscular reduziu de forma semelhante a concentração de glicogênio muscular em ambas as metodologias. Além disso, o EIAI começou com níveis igualmente baixos de glicogênio muscular nas duas metodologias. Portanto, quaisquer diferenças adicionais na expressão de genes entre abordagens de treinamento deveriam ser causadas pelo diferente período de recuperação entre os exercícios, do que apenas pelo reduzido conteúdo de glicogênio muscular.

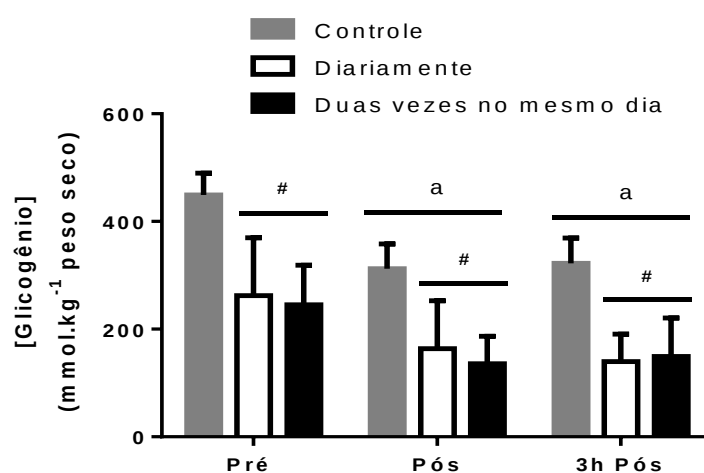


Figura 2. Concentração de glicogênio muscular pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI). Dados apresentados em média $\pm$ DP. $n = 8$. # significativamente diferente da condição controle ($p < 0,05$); a, significativamente diferente do pré EIAI para a mesma condição experimental ($p < 0,05$).

6.2 A expressão de genes nucleares e mitocondriais durante o EIAI

O RNAm de PGC-1 α total e da isoforma 4 de PGC-1 α foram maiores na condição treinar duas vezes no mesmo dia comparado com as condições treinar diariamente e controle ($p < 0,05$; Figura 3a,c). Além disso, o RNAm da isoforma 1 de PGC-1 α foi maior na condição treinar duas vezes no mesmo dia quando comparado a condição treinar diariamente ($p < 0,05$; Figura 3b). O RNAm de p53 também foi maior na condição treinar duas vezes no mesmo dia comparado a condição controle ($p < 0,05$; Figura 3d). O RNAm de Tfam, NDUF (complexo mitocondrial I), SDH (complexo mitocondrial II), citocromo c (complexo mitocondrial III) e COX IV (complexo mitocondrial IV) foram semelhantes entre as condições, apesar da transcrição dos complexos mitocondriais II-IV estarem maiores 3h pós EIAI quando comparado ao pré EIAI (Figura 3e-i).

Esses achados fornecem evidências de que a transcrição gênica de PGC-1 α e p53 é potencializada quando duas sessões de exercício são realizadas com proximidade, embora os genes dos complexos mitocondriais não sejam afetados pelas metodologias de treinamento.

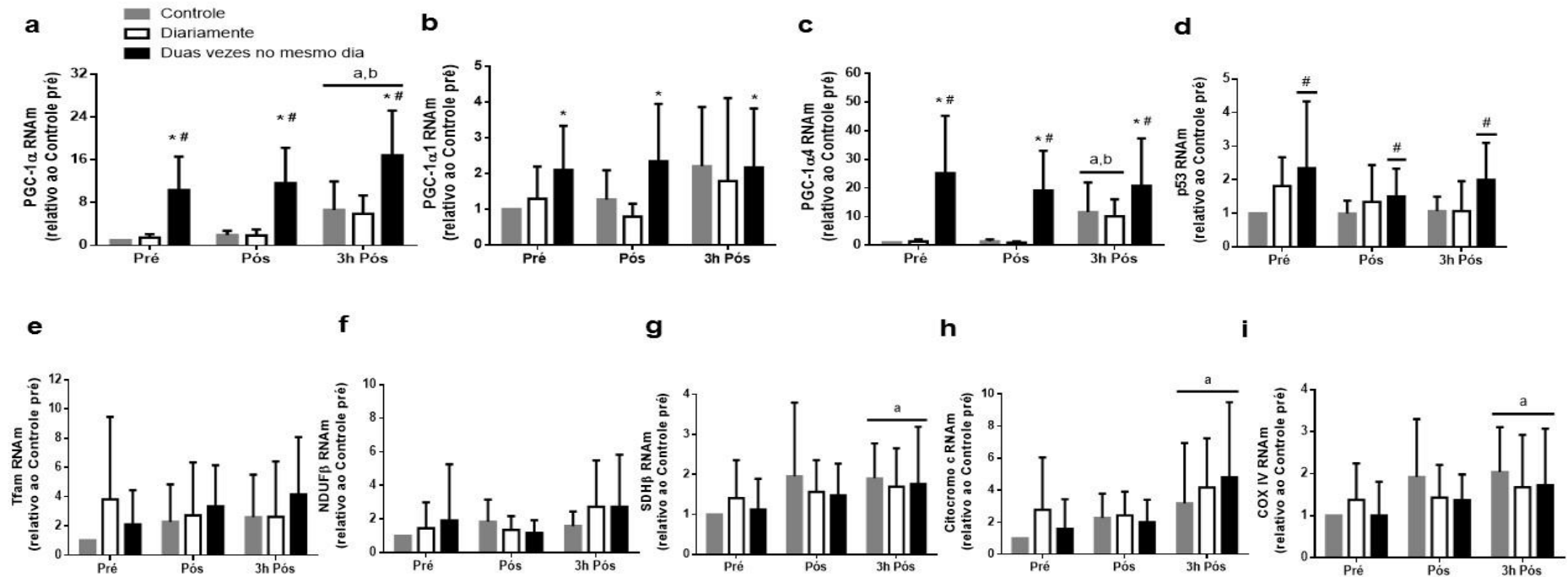


Figura 3. Genes mitocondriais pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI). Expressão gênica da *peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1* (PGC-1α) (a), PGC-1α isoforma 1 (b), PGC-1α isoforma 4 (c), proteína p53 (p53) (d), fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) (e), NDUFβ (complexo mitocondrial I) (f), succinato desidrogenase subunidade β (SDHβ) (complexo mitocondrial II) (g), citocromo c (complexo mitocondrial III) (h), citocromo c oxidase subunidade IV (COXIV) (complexo mitocondrial IV) (i). Dados são apresentados em média ± DP (n = 8, exceto para “e” n = 7). * significativamente diferente da condição treinar diariamente (p < 0,05). # significativamente diferente da condição controle (p < 0,05); a, significativamente diferente do pré EIAI para a mesma condição experimental (p < 0,05). b, significativamente diferente do pós EIAI para a mesma condição experimental (p < 0,05).

6.3 A expressão de genes relacionados ao transporte de lipídios e a lipólise durante o EIAI

O RNAm de CPT1 foi maior nas condições treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente comparado a condição controle ($p < 0,05$; Figura 4a). O RNAm de UCP3 foi maior na condição treinar duas vezes no mesmo dia comparado a condição controle ($p < 0,05$; Figura 4b). O RNAm de PPAR α foi maior na condição treinar duas vezes no mesmo dia comparado as condições treinar diariamente e controle ($p < 0,05$; Figura 4c). O RNAm de PPAR β/δ foi maior na condição treinar duas vezes no mesmo dia comparado a condição controle pós EIAI e maior quando comparado as condições treinar diariamente e controle 3h após EIAI ($p < 0,05$; Figura 4d). O RNAm de PPAR β/δ foi maior às 3h após EIAI em comparação com pré e pós EIAI apenas para a condição treinar duas vezes no mesmo dia. Contudo, os RNAm de PPAR γ , CS, β -HAD e CD-36 não foram afetados pelas metodologias ou tempo (Figura 4e-h).

Conjuntamente, esses achados sugerem que a transcrição de PPAR α , PPAR β/δ e UCP3 foram potencializadas realizando-se duas sessões de exercícios com demasiada proximidade, enquanto o RNAm de CPT1 parece ser um efeito do baixo conteúdo de glicogênio muscular por si, uma vez que foi aumentado em ambas as condições treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente.

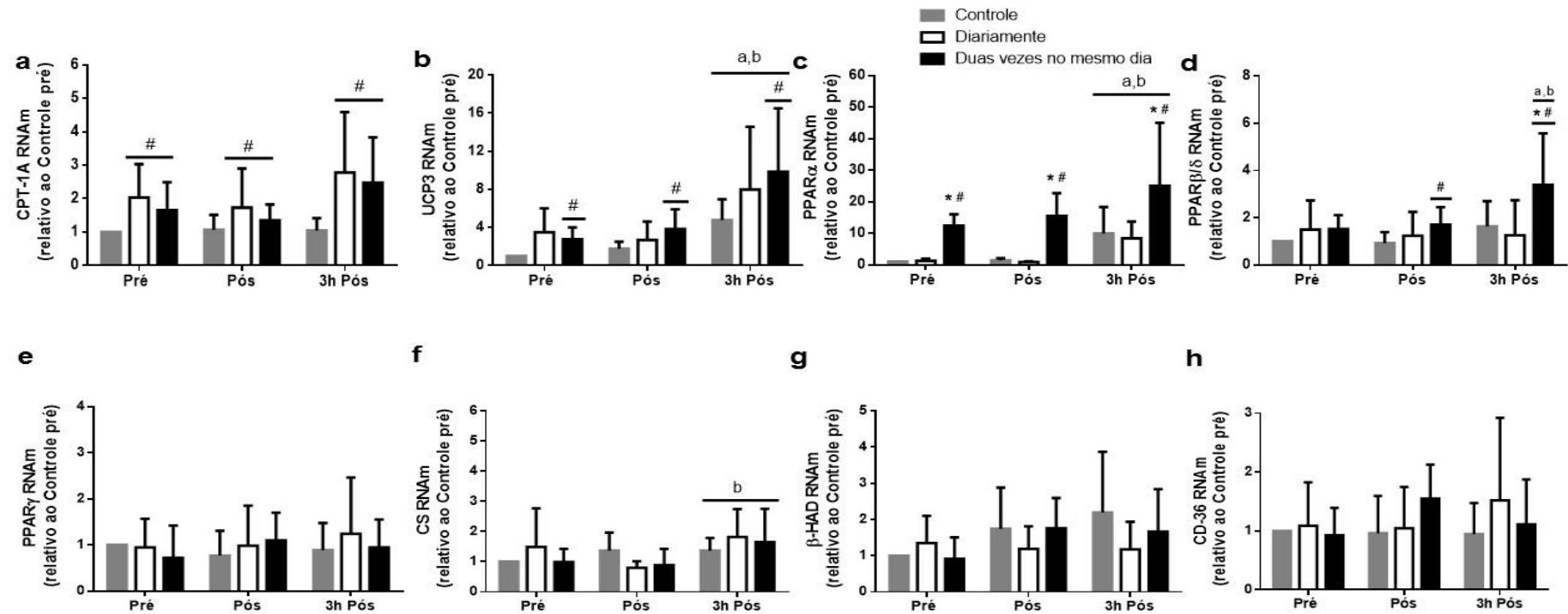


Figura 4. Expressão dos genes relacionados com o transporte de lipídios e lipólise pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI). Expressão gênica de carnitil palmitoltransferase I (CPT1) **(a)**, proteína desacopadora 3 (UCP3) **(b)**, *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α) **(c)**, *peroxisome proliferator-activated receptor β/δ* (PPAR β/δ) **(d)**, *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) **(e)**, citrato sintase (CS) **(f)**, β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD) **(g)**, grupo de diferenciação 36 da translocase de ácidos graxos (CD-36) **(h)**. Dados apresentados em média $\pm$ DP, n = 8, exceto para **b** e **f** (n = 7). * significativamente diferente da condição treinar diariamente (p < 0,05). # significativamente diferente da condição controle (p < 0,05); a, significativamente diferente do pré EIAI para a mesma condição experimental (p < 0,05). b, significativamente diferente do pós EIAI para a mesma condição experimental (p < 0,05).

6.4 A expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e atividade do lisossomo durante EIAI

Os RNAm de PFK, GLUT4, TFEB, CHCHD4 e p21 não foram afetados pelas metodologias de treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular, enquanto o RNAm de PDK4 aumentou 3h pós EIAI, mas não houve diferenças entre as condições (Figura 5a-f), sugerindo que os genes relacionados a oxidação de CHO, mitofagia atividade do lisossomo não são afetados por essas metodologias de treino.

6.5 Respostas fisiológicas durante o EIAI

Treinar duas vezes no mesmo dia aumentou a FC, $\dot{V}E$ e $\dot{V}O_2$ e diminuiu a glicose plasmática comparado as condições treinar diariamente e controle ($p < 0,05$; Figura 6a-c e Tabela 2). A glicose plasmática também foi menor na condição treinar diariamente comparado a condição controle ($p < 0,05$; Tabela 2). Adicionalmente, RER foi menor e a concentração de AGL maior que na condição controle somente na condição treinar duas vezes no mesmo dia ($p < 0,05$; Figura 6d e Tabela 2). Após EIAI, a concentração de glicerol foi maior e a concentração plasmática de lactato foi menor em ambas as metodologias treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente, comparado a condição controle ($p < 0,05$; Tabela 2). As concentrações de epinefrina e norepinefrina não foram influenciadas pelas metodologias de treinar com reduzido conteúdo de glicogênio muscular.

Assim, esses achados sugerem um elevado estresse fisiológico e uma elevada taxa de oxidação de lipídios na condição treinar duas vezes no mesmo dia.

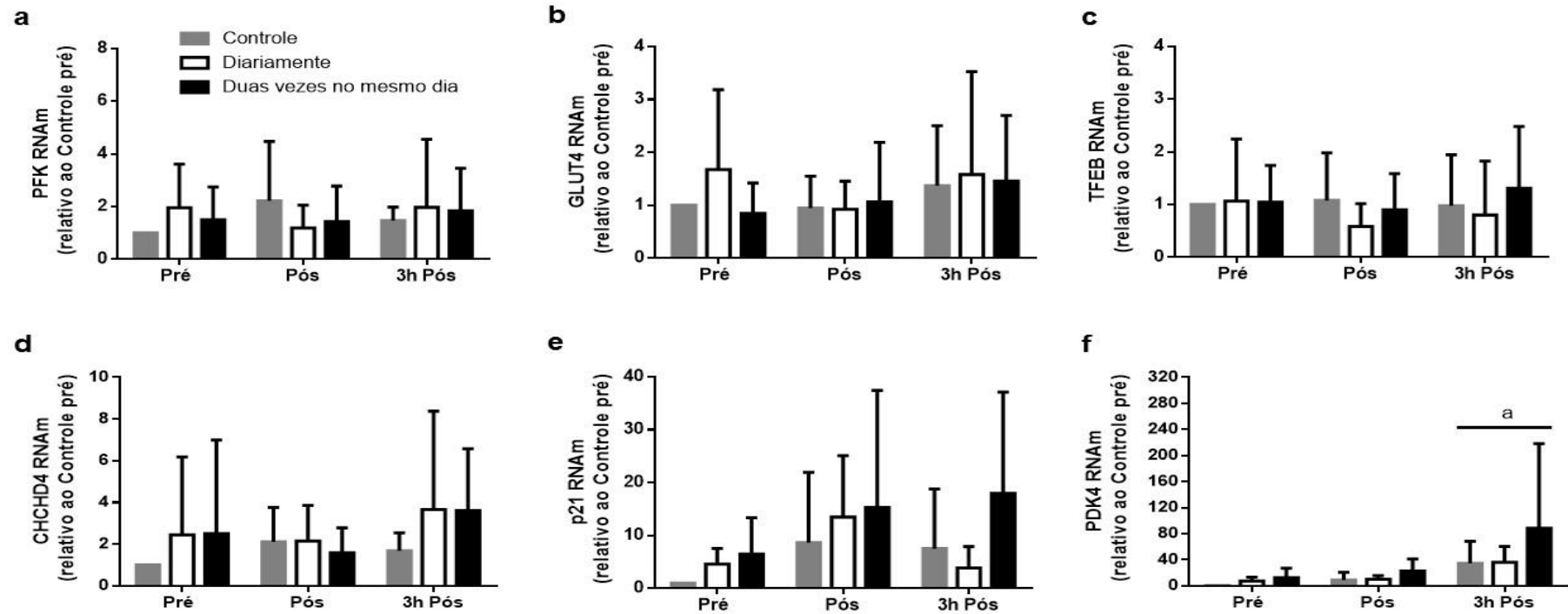


Figura 5. Expressão dos genes relacionados a oxidação de carboidratos e mitofagia pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI). Expressão gênica de fosfofrutoquinase (PFK) **(a)**, transportador de glicose 4 (GLUT4) **(b)**, fator de transcrição de alongamento (TFEB) **(c)**, *chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4* (CHCHD4) **(d)**, proteína p21 (p21) **(e)**, piruvato desidrogenase kinase isoenzima 4 (PDK4) **(f)**. Dados apresentados em média $\pm$ DP, $n = 8$, exceto para **d** ($n = 7$). * significativamente diferente da condição treinar diariamente ($p < 0,05$). # significativamente diferente da condição controle ($p < 0,05$); a, significativamente diferente do pré EIAI para a mesma condição experimental ($p < 0,05$). b, significativamente diferente do pós EIAI para a mesma condição experimental ($p < 0,05$).

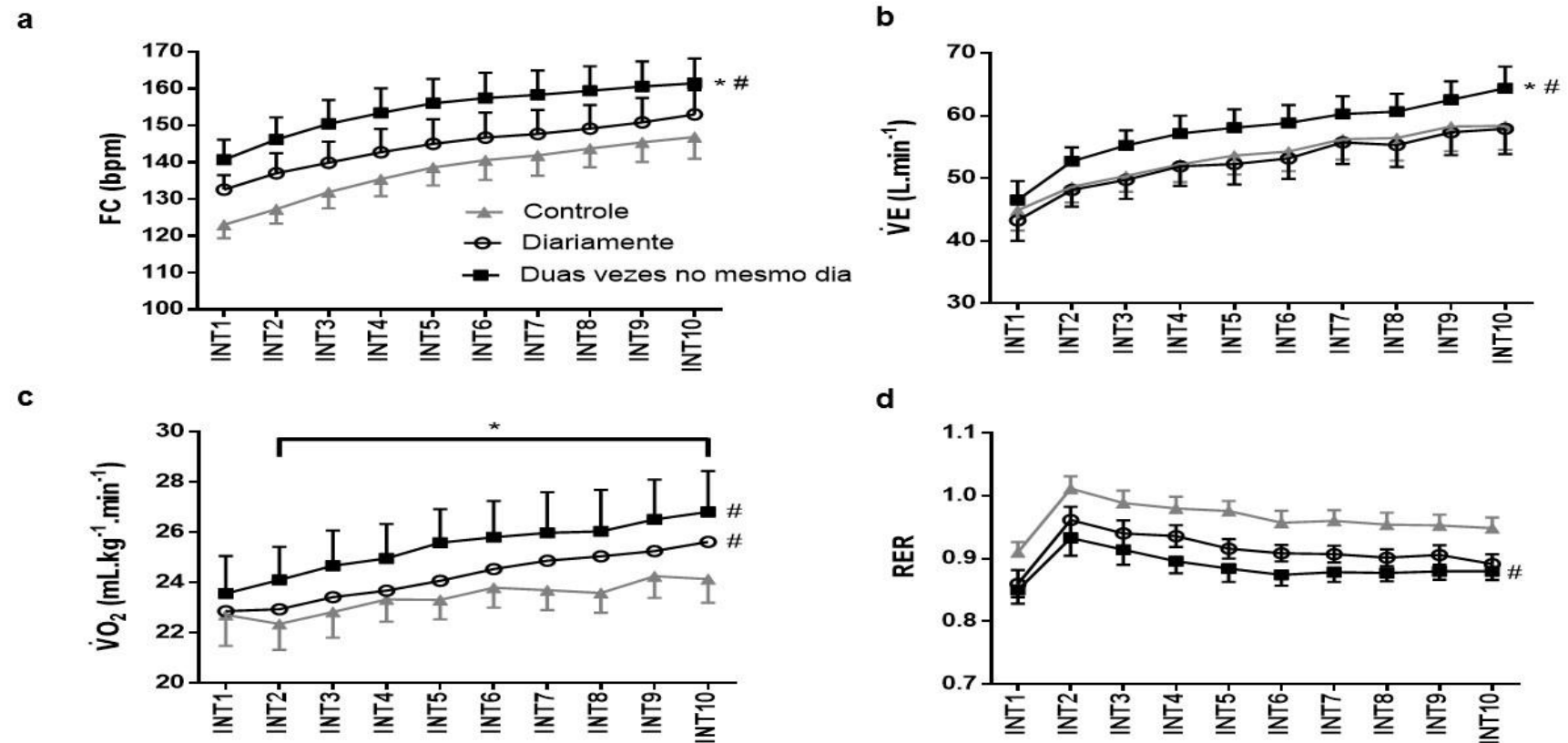


Figura 6. Respostas fisiológicas e sistêmicas durante o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI). **(a)** FC. **(b)** ventilação ($\dot{V}E$). **(c)** consume de oxigênio ($\dot{V}O_2$). **(d)** razão de trocas respiratórias (RER). Dados apresentados em média $\pm$ DP. n = 8. INT, intervalo. Efeito do tempo foi omitido para maior clareza. * significativamente diferente da condição treinar diariamente ($p < 0,05$). # significativamente diferente da condição controle ($p < 0,05$).

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de lactato, glicose, epinefrina and norepinefrina, e concentração sérica de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol pré, pós e 3h após o exercício intervalado de alta intensidade (EIAI).

	Pré EIAI	Pós EIAI	3h pós EIAI
Plasma			
[Lactato] (mmol·L⁻¹)			
<i>Controle</i>	1,2 ± 0,7 ^b	6,2 ± 2,0	1,3 ± 0,4 ^b
<i>Diariamente</i>	0,9 ± 0,3 ^b	3,9 ± 1,0 [#]	1,2 ± 0,4 ^b
<i>Duas vezes no mesmo dia</i>	1,4 ± 0,5 ^b	4,0 ± 1,6 [#]	2,0 ± 0,7 ^b
[Glicose] (mmol·L⁻¹)			
<i>Controle</i>	5,2 ± 0,8	5,5 ± 0,9	5,3 ± 0,8
<i>Diariamente</i>	5,2 ± 0,5	5,0 ± 0,8 [#]	4,8 ± 0,7 ^a
<i>Duas vezes no mesmo dia</i>	4,4 ± 0,7 * [#]	4,8 ± 1,1 [#]	4,3 ± 1,0 * ^{# b}
[Epinefrina] (pg·mL⁻¹)			
<i>Controle</i>	32,2 ± 18,4	39,3 ± 22,7	36,7 ± 17,8
<i>Diariamente</i>	56,7 ± 25,4	54,2 ± 25,7	35,8 ± 34,8
<i>Duas vezes no mesmo dia</i>	43,1 ± 13,6	43,7 ± 19,0	36,7 ± 10,4
[Norepinefrina] (pg·mL⁻¹)			
<i>Controle</i>	68,0 ± 34,6 ^b	231,1 ± 141,8	120,4 ± 90,3 ^b
<i>Diariamente</i>	70,7 ± 33,8 ^b	350,6 ± 139,8	105,5 ± 77,5 ^b
<i>Duas vezes no mesmo dia</i>	76,7 ± 49,1 ^b	287,5 ± 147,6	113,8 ± 44,6 ^b
Sérum			
[AGL] (μM)			
<i>Controle</i>	194,9 ± 118,2	118,6 ± 72,6	130,3 ± 72,1
<i>Diariamente</i>	155,5 ± 79,9	236,5 ± 151,4	158,0 ± 62,8
<i>Duas vezes no mesmo dia</i>	209,9 ± 125,5 [#]	260,6 ± 151,3 [#]	230,4 ± 98,2 [#]
[Glicerol] (mmol·L⁻¹)			
<i>Controle</i>	0,105 ± 0,021	0,098 ± 0,025	0,098 ± 0,037
<i>Diariamente</i>	0,090 ± 0,037 ^b	0,141 ± 0,022 [#]	0,100 ± 0,039 ^b
<i>Duas vezes no mesmo dia</i>	0,106 ± 0,031 ^b	0,169 ± 0,046 [#]	0,102 ± 0,023 ^b

Dados apresentados em média ± DP. n = 8. * significativamente diferente da condição treinar diariamente (p < 0,05). # significativamente diferente da condição controle (p < 0,05); a, significativamente diferente do pré EIAI para a mesma condição experimental (p < 0,05). b, significativamente diferente do pós EIAI para a mesma condição experimental (p < 0,05).

7 DISCUSSÃO

Os principais resultados reportados na presente tese suportam a hipótese estipulada de que a maior transcrição de genes envolvidos a biogênese mitocondrial induzida pelo exercício realizado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular é atribuída à realização de dois exercícios no mesmo dia e não ao baixo conteúdo de glicogênio muscular por si. O EIAI começou com baixos níveis de glicogênio muscular nas duas metodologias treinar diariamente e duas vezes no mesmo dia. No entanto, a transcrição de PGC-1 α , PPAR α e PPAR β/δ foram potenciadas quando se realizou dois exercícios no mesmo dia, comparado com as metodologias treinar diariamente e controle. Ademais, houve um maior estresse fisiológico, como demonstrado por uma maior FC, $\dot{V}E$, $\dot{V}O_2$, AGL e glicerol na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia, comparado as treinar diariamente e controle.

Mesmo com diferentes períodos de recuperação entre as sessões de exercício, as concentrações de glicogênio muscular antes do EIAI foram menores em ambas as metodologias treinar diariamente e duas vezes no mesmo dia, quando comparado ao controle (~42 e 45% menores, respectivamente, Figura 2). A redução nas concentrações de glicogênio muscular encontradas no presente estudo é consistente com estudos prévios que utilizaram tanto a metodologia treinar duas vezes no mesmo dia (YEO *et al.*, 2008; YEO *et al.*, 2010) quanto a treinar diariamente (PSILANDER *et al.*, 2013). O EIAI reduziu similarmente a concentração de glicogênio muscular em todos os ensaios experimentais, permanecendo menor nas metodologias treinar diariamente e duas vezes no mesmo dia comparado ao controle pós EIAI. Embora a intensidade do EIAI tenha sido controlada (~80% PAM) e a duração dos estímulos tenha sido diferente, essa redução no conteúdo de glicogênio muscular após a realização do EIAI foi similar ao estudo de Yeo *et al.* (2010) que utilizou um protocolo de treino onde a intensidade foi auto selecionada. Portanto, a similar concentração de glicogênio muscular ao se iniciar o EIAI em ambas as metodologias treinar diariamente e treinar duas vezes no mesmo dia permite considerar que quaisquer diferenças nas expressões gênicas observadas entre as duas metodologias de treino com reduzido conteúdo de glicogênio muscular foram

consequências da realização de duas sessões de exercício com demasiada proximidade do que pelo conteúdo de glicogênio muscular por si.

PGC-1 α pertence a uma família de cofatores de transcrição que se liga a diversos receptores transcricionais no núcleo promovendo a transcrição de genes nucleares e mitocondriais que atuam diretamente na regulação do conteúdo e da função mitocondrial (SCARPULLA, 2008). Dentre os receptores transcricionais que se ligam a PGC-1 α encontram-se os fatores nucleares respiratórios (NRF-1 e NRF-2), o receptor relacionado a estrógenos (ERR α) e receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos (PPARs) (SCARPULLA *et al.*, 2012). Uma única sessão de exercício é capaz de aumentar a expressão gênica de PGC-1 α entre 1,5 a 7-10 vezes mais (BAAR *et al.*, 2002; PILEGAARD *et al.*, 2003; GIBALA *et al.*, 2009; LITTLE *et al.*, 2011; GRANATA *et al.*, 2017). Antes de iniciar o EIAI, o RNAm de PGC-1 α foi ~10 vezes maior na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia comparado as metodologias treinar diariamente e controle (Figura 3). 3h após o EIAI, o conteúdo de RNAm de PGC-1 α se elevou nos três ensaios experimentais, sendo ~6 vezes maior nas metodologias treinar diariamente e controle comparados ao controle pré EIAI. Entretanto, esse aumento de PGC-1 α total RNAm 3h pós EIAI foi potencializado na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia (~16 vezes maior que o controle pré). Uma resposta similar foi obtida para o RNAm de PGC-1 α 4 e PGC-1 α 1 (Figura 3). Esses resultados corroboram com estudos que utilizaram a tanto a metodologia treinar diariamente (BARTLETT *et al.*, 2013; PSILANDER *et al.*, 2013) quanto a metodologia treinar duas vezes no mesmo dia (COCHRAN *et al.*, 2010). Entretanto, esses achados fornecem evidências de que a transcrição gênica de PGC-1 α e de suas isoformas é potencializada quando duas sessões de exercício são realizadas com proximidade, sugerindo que a metodologia de treinar duas vezes no mesmo dia é mais efetiva para elevar a biogênese mitocondrial.

Após essas evidências fornecidas pelo aumento do RNAm de PGC-1 α , foi investigado se esse comportamento também iria se repetir em outros genes nucleares e mitocondriais. O RNAm de p53 foi maior na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia comparado ao controle (Figura 3). A p53 é regulada pela atividade contrátil após uma única sessão de EIAI (BARTLETT *et al.*, 2012) e, assim como PGC-1 α , é reguladora do maquinário de transcrição mitocondrial pela modulação do fator de

transcrição mitocondrial A (Tfam) (PARK *et al.*, 2009). Entretanto, ambos os modelos de treino não foram capazes de afetar o RNAm de Tfam e de NDUF (complexo mitocondrial I) (Figura 3). A ausência de efeitos sobre o RNAm de Tfam é corroborado por estudos que utilizaram a metodologia treinar diariamente (BARTLETT *et al.*, 2013; PSILANDER *et al.*, 2013), embora uma única sessão de exercício aeróbio seja capaz de aumentar a resposta do RNAm de Tfam (PILEGAARD *et al.*, 2003; PERRY *et al.*, 2010). Tfam é uma proteína multifuncional que tem um papel vital na replicação do DNA mitocondrial, além da transcrição de genes no genoma mitocondrial (ERLICH *et al.*, 2016). Assim, a expressão de genes codificados pelo DNA mitocondrial (p53 e Tfam) é requerida para uma formação apropriada dos complexos mitocondriais que compõem a cadeia transportadora de elétrons (ERLICH *et al.*, 2016). Assim, nossos resultados sugerem que um aumento da p53 e da PGC-1 α não é suficiente para alterar Tfam, independentemente do tipo de treino.

Por outro lado, o RNAm dos complexos mitocondriais II-IV (SDH, citocromo c e COX-IV, respectivamente) aumentaram 3h após o EIAI, porém não houveram diferenças entre as condições (Figura 3). Estudos prévios apresentam resultados conflitantes quanto ao aumento do RNAm de COX-IV após o EIAI realizado com baixo glicogênio muscular. Enquanto um estudo encontrou que o conteúdo de RNAm de COX-IV aumentou após a metodologia treinar diariamente (BARTLETT *et al.*, 2013), outros estudos não encontraram efeito no RNAm de COX-IV com a utilização das metodologias treinar diariamente (PSILANDER *et al.*, 2013) e treinar duas vezes no mesmo dia (COCHRAN *et al.*, 2010). Nosso estudo foi o primeiro a investigar as respostas dos genes relacionados aos complexos mitocondriais II e III ao exercício com o conteúdo de glicogênio muscular reduzido. Nossos resultados, portanto, corroboram esses últimos achados, mostrando um improvável efeito do treinamento com baixo glicogênio muscular sobre a expressão de COX-IV, independente da metodologia de treino.

Como o treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular aumentou a transcrição de PGC-1 α e p53 os quais poderiam afetar o metabolismo de lipídios, os genes relacionados ao transporte de lipídios e lipólise foram avaliados. Ambas as metodologias de treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular aumentaram o RNAm de CPT1 comparado ao controle (Figura 4). Esse achado não

corroborar com o reportado por Bartlett et al. (2013) que observaram que treinar diariamente não afeta a expressão de CPT1. Esse efeito positivo sobre o RNAm da CPT1 parece ser um efeito do baixo conteúdo de glicogênio muscular por si, uma vez que foi observado em ambas as metodologias treinar duas vezes no mesmo dia e treinar diariamente. Portanto, o aumento da transcrição de CPT1 em ambas as metodologias sugere que treinar com reduzido conteúdo de glicogênio muscular pode ser uma alternativa para aumentar o transporte intracelular de lipídios. Entretanto, o RNAm de UCP3 foi maior na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia comparado ao controle (Figura 4), um resultado similar ao encontrado previamente (PILEGAARD *et al.*, 2002), e que indica um certo favorecimento a metodologia treinar duas vezes no mesmo dia. Por outro lado, os RNAm de CS, β -HAD e CD-36 não foram diferentes entre as metodologias com baixo conteúdo de glicogênio muscular. Esses resultados são corroborados por estudos que utilizaram a metodologia treinar diariamente (PSILANDER *et al.*, 2013; LANE *et al.*, 2015) e sugere não distinção entre as metodologias de treinamento nesse aspecto.

Um resultado interessante é que Pré EIAI, o RNAm de PPAR α foi ~12 vezes maior na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia comparado as metodologias treinar diariamente e controle. O conteúdo de RNAm de PPAR α se elevou nos três ensaios experimentais 3h pós EIAI, sendo ~8 vezes maior nas metodologias treinar diariamente e controle comparados ao pré controle. Entretanto, esse aumento do RNAm de PPAR α 3h pós EIAI foi potencializado na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia (~24 vezes maior que o controle pré). Adicionalmente, o RNAm de PPAR β/δ foi ~3 vezes maior na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia quando comparado as metodologias treinar diariamente e controle 3h pós EIAI. Os efeitos da realização de exercício com baixo conteúdo de glicogênio muscular no RNAm de PPAR β/δ contrastam com os resultados prévios de que treinar diariamente não afetou a transcrição PPAR β/δ (PSILANDER *et al.*, 2013). Os receptores nucleares possuem um importante papel na transcrição de genes codificadores de enzimas e proteínas mitocondriais (SCARPULLA *et al.*, 2012). A família das PPARs são ativadas por uma variedade de ligações lipídicas contendo ácidos graxos, que regulam vários aspectos do metabolismo de lipídios bem como da diferenciação celular (SCARPULLA *et al.*, 2012). Por exemplo, PPAR α regula genes nucleares responsáveis por codificar enzimas da oxidação de lipídios na mitocôndria (MADRAZO e KELLY, 2008). Por sua

vez, PPAR β/δ é a isoforma predominante no músculo esquelético e é considerada a principal reguladora da oxidação de lipídios através da associação de enzimas ligadas a β -oxidação (WANG *et al.*, 2003). Recentes achados demonstraram que PPAR β/δ é um potente protetor da proteína PGC-1 α contra a degradação, e que regula proteínas da cadeia respiratória mitocondrial, o que aumenta a possibilidade de que a proteína PPAR β/δ também tem um papel essencial no aumento da biogênese mitocondrial induzido pelo exercício (KOH *et al.*, 2017). Portanto, esses achados fornecem evidências de que a transcrição gênica das isoformas das PPARs é também potencializada quando duas sessões de exercício são realizadas com proximidade, sugerindo que treinar duas vezes no mesmo dia é uma estratégia mais eficiente para aumentar a oxidação de lipídios e biogênese mitocondrial.

A redução do glicogênio muscular ou ainda a realização de duas sessões de exercício com curto período de recuperação entre elas poderia afetar o metabolismo de CHO e/ou a biogênese e função dos lisossomos. Os RNAm de PFK, GLUT4, TFEB, CHCHD4 e p21 não foram afetados pelas metodologias de treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular, enquanto o RNAm de PDK4 aumentou com o EIAI, mas não houve diferenças entre os ensaios experimentais (Figura 5). Era esperado que os genes relacionados a mitofagia fossem afetados pela realização do EIAI com reduzido conteúdo de glicogênio muscular, principalmente pela metodologia treinar duas vezes no mesmo dia, haja vista que PGC-1 α é o principal regulador da proteína TFEB (HOOD *et al.*, 2016). Em resposta ao exercício, a proteína TFEB é desfosforilada e pode se translocar para dentro do núcleo (MEDINA *et al.*, 2015), sugerindo o papel do exercício associado a biogênese e função dos lisossomos (HOOD *et al.*, 2016). Contudo, os achados do presente estudo sugerem que o EIAI realizado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular parece não afetar a expressão gênica de genes relacionados à mitofagia. Por outro lado, esse aumento no RNAm de PDK4 corroboram com os estudos que observaram que o RNAm de PDK4 aumenta com o EIAI, independente da concentração de glicogênio muscular prévia ao exercício (BARTLETT *et al.*, 2013; PSILANDER *et al.*, 2013). PGC-1 α também está envolvida na seleção do substrato energético e o aumento da expressão gênica de PDK4 poderia induzir a um aumento no metabolismo de lipídios (OLESEN *et al.*, 2010). Interessantemente, a baixa disponibilidade de CHO poderia ser outro fator a influenciar o aumento na proteína PDK4 independente do exercício

(CLUBERTON *et al.*, 2005). Dessa forma, os achados do presente estudo sugerem que o metabolismo de CHO é atenuado pós EIAI, independente da disponibilidade de glicogênio muscular prévia ao exercício.

Reduzir a disponibilidade de CHO endógeno e realizar duas sessões de exercícios intensos com demasiada proximidade poderia afetar as respostas fisiológicas ao exercício. O exercício com reduzido conteúdo de glicogênio muscular aumentou as concentrações plasmáticas de glicerol, independente da metodologia utilizada, quando comparado ao controle, corroborando com os achados de Bartlett *et al.* (2013) que reportaram um aumento na concentração de glicerol após a realização do EIAI na metodologia treinar diariamente (Tabela 2). Adicionalmente, treinar duas vezes no mesmo dia induziu a um aumento na FC, $\dot{V}E$ e $\dot{V}O_2$ quando comparado as metodologias treinar diariamente e controle, além de um aumento concentração de AGL circulantes quando comparado ao controle (Figura 6 e Tabela 2). Assim, esses achados sugerem elevado estresse fisiológico e elevada taxa de oxidação de lipídios na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia. Embora seja difícil estabelecer uma relação de causa e efeito, esse alterado perfil fisiológico talvez contribua para a maior sinalização gênica observada na metodologia treinar duas vezes no mesmo dia. De fato, foi sugerido previamente que um maior AGL circulante poderia agir como um sinalizador para aumentar PGC-1 α e PPARs, principalmente a isoforma PPAR β/δ (NAWROCKI e GORSKI, 2004; GARCIA-ROVES *et al.*, 2007; HOLLOSZY, 2008; NARKAR *et al.*, 2008).

Contudo, é interessante observar que em nível molecular, as adaptações na função e conteúdo mitocondrial são o resultado dos efeitos cumulativos de mudanças transitórias na transcrição de vários genes após cada sessão aguda de exercício (PERRY *et al.*, 2010). Portanto, é possível suspeitar que sucessivas sessões de EIAI realizadas após uma sessão de exercício prolongado visando a depleção do glicogênio muscular, ou seja, treinar duas vezes no mesmo dia, poderá causar adaptações positivas na função e conteúdo das mitocôndrias.

8 APLICAÇÕES PRÁTICAS

Apesar do presente estudo ser de característica aguda, buscando entender as respostas imediatas a realização de um EIAI iniciado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular usando diferentes metodologias de treinamento, as evidências encontradas demonstram que a realização de duas sessões de exercício com demasiada proximidade potencializa a transcrição gênica de PGC-1 α , PPAR α e PPAR β/δ , genes esses que estão envolvidos na sinalização necessária para induzir a biogênese mitocondrial. Embora não seja possível afirmar que essas respostas agudas levarão a uma melhora no desempenho esportivo, sugere-se que treinar duas vezes no mesmo dia é uma estratégia mais eficiente para induzir adaptações relacionadas biogênese mitocondrial e a oxidação de lipídios.

Não é surpreendente que os benefícios do treino com reduzido conteúdo do glicogênio muscular têm gerado excitação dentro da comunidade esportiva. Infelizmente, há evidências de não entendimento dos princípios e da prática do treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular por parte dos atletas, treinadores e até mesmo cientistas esportivos (PHILP *et al.*, 2011). Um dos pontos de equívoco por partes dos treinadores se dá ao fato de que os atletas não devem iniciar todas as sessões de treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular. Por exemplo, na utilização da metodologia treinar duas vezes no mesmo dia, após a segunda sessão treino há a ingestão de uma dieta com alto conteúdo de carboidratos visando uma supercompensação do glicogênio muscular e os atletas iniciarem a sessão de treino seguinte com os estoques de glicogênio muscular já reestabelecidos.

Entretanto, a possibilidade de que protocolos de treinamento com duas sessões no mesmo dia possam reduzir a capacidade de treinar em altas intensidades requer atenção. Muitos técnicos descrevem programas de treinamento no qual os atletas são requeridos a trabalhar em intensidades específicas acima dos seus “pacing de prova”, onde o sucesso de muitos esportes é definido pela velocidade do sprint final. Intuitivamente, sacrificando a capacidade de treinar em altas intensidades deveria ser feita com cautela por parte dos treinadores até que mais evidências possam ser mostradas de que esse tipo de estratégia não prejudica o desempenho (PHILP *et al.*,

2011). Por outro lado, treinar duas vezes no mesmo dia com demasiada proximidade durante a pré-temporada competitiva pode ser uma alternativa para atletas gerarem maiores adaptações nesse período específico do calendário de treinamento e formar a base para o período competitivo.

Da mesma forma, o modelo de treinamento com duas sessões realizadas no mesmo dia também pode ser uma estratégia importante para manutenção da saúde, por exemplo, para indivíduos que apresentam síndrome metabólica, pois treinar com essa metodologia poderia ser uma alternativa para aumentar a oxidação de lipídios e consequentemente reduzir os riscos ligados à obesidade.

Apesar de não ter sido o objetivo do presente estudo, a discussão dos efeitos crônicos do treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular parece estar focada nos benefícios, muitas vezes se esquecendo de observar os efeitos colaterais dessa estratégia (PHILP *et al.*, 2011). Existe a possibilidade de que essa alta regulação da utilização de lipídios durante o exercício esteja associada a desregulação da utilização de carboidratos. De fato, em adaptações a dieta hiperlipídica pode resultar em uso inapropriado de glicogênio muscular durante a competição devido a redução da atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH), resultando na diminuição da entrada de carboidratos no ciclo de Krebs (STELLINGWERFF *et al.*, 2006). Essa falha na oxidação de carboidratos pode impedir a sustentação de altas intensidades durante eventos de endurance (HAVEMANN *et al.*, 2006). Adicionalmente, a magnitude das respostas de hormônios do estresse (adrenalina e cortisol) e citosinas (IL-6, IL-1ra e IL-10) são significativamente maiores quando indivíduos realizam cronicamente treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio do que situações em que o conteúdo de glicogênio muscular é normal, tendo sido especulado que os atletas que treinam cronicamente com essa deficiência de carboidratos estão se colocando em risco devido ao efeito imunossupressor do cortisol, incluindo a supressão da produção de anticorpos, proliferação de linfócitos e a morte natural de células com atividades citotóxicas (GLEESON *et al.*, 2004). Ademais, a redução crônica do conteúdo de glicogênio pode causar sintomas como sonolência, função perceptiva e cognitiva prejudicada e transtorno de afetividade que são considerados sintomas da fadiga do sistema nervoso central (DAVIS *et al.*, 2000). Finalmente, o efeito de se treinar repetidamente com reduzido conteúdo de glicogênio

muscular pode aumentar o risco de doenças, lesões e overtraining, que também precisam ser considerados (BROUNS *et al.*, 1986; PETIBOIS *et al.*, 2003; GLEESON *et al.*, 2004).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que a elevada sinalização induzida pelo exercício realizado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular previamente reportada na literatura deveria ser parcialmente atribuída à realização de duas sessões de exercício com demasiada proximidade, do que exclusivamente pelo reduzido conteúdo de glicogênio muscular. Foram apresentadas evidências que a realização de duas sessões de exercício com demasiada proximidade potencializa a transcrição de genes como PGC-1 α , PPAR α e PPAR β/δ , que estão envolvidos na sinalização necessária para induzir a biogênese mitocondrial. Dessa forma, sugere-se que treinar duas vezes no mesmo dia é uma estratégia mais eficiente para induzir adaptações relacionadas biogênese mitocondrial e a oxidação de lipídios.

REFERÊNCIAS

Andersen, CL; Jensen, JL; Orntoft, TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-50, Aug 01 2004.

Andersen, P; Henriksson, J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. **Journal of Physiology**, v. 270, n. 3, p. 677-90, Sep 1977a.

_____. Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 99, n. 1, p. 123-5, Jan 1977b.

Baar, K; Mcgee, S. Optimizing training adaptations by manipulating glycogen. **European Journal of Sport Science**, v. 8, n. 2, p. 97-106, 2008.

Baar, K et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. **FASEB Journal**, v. 16, n. 14, p. 1879-86, Dec 2002.

Bartlett, JD; Hawley, JA; Morton, JP. Carbohydrate availability and exercise training adaptation: Too much of a good thing? **European Journal of Sport Science**, v. 15, n. 1, p. 3-12, Jan 2 2015.

Bartlett, JD et al. Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1alpha mRNA, AMPK, p38, and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 112, n. 7, p. 1135-43, Apr 2012.

Bartlett, JD et al. Reduced carbohydrate availability enhances exercise-induced p53 signaling in human skeletal muscle: implications for mitochondrial biogenesis. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 6, p. R450-R458, Mar 2013.

Bergström, J. Muscle electrolytes in man determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 14, p. 1-110, 1962.

Bishop, D; Jenkins, DG; Mackinnon, LT. The relationship between plasma lactate parameters, W-peak and 1-h cycling performance in women. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 8, p. 1270-1275, Aug 1998.

Brouns, F; Saris, WH; Ten Hoor, F. Nutrition as a factor in the prevention of injuries in recreational and competitive downhill skiing. Considerations based on the literature. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness** v. 26, n. 1, p. 85-91, Mar 1986.

Cheng, B et al. A new approach for the determination of ventilatory and lactate thresholds. **International Journal of Sports Medicine**, v. 13, n. 7, p. 518-22, Oct 1992.

Cluberton, LJ et al. Effect of carbohydrate ingestion on exercise-induced alterations in metabolic gene expression. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 99, n. 4, p. 1359-63, Oct 2005.

Cochran, AJR et al. Carbohydrate feeding during recovery alters the skeletal muscle metabolic response to repeated sessions of high-intensity interval exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 3, p. 628-636, Mar 2010.

Cochran, AJR et al. Manipulating Carbohydrate Availability Between Twice-Daily Sessions of High-Intensity Interval Training Over 2 Weeks Improves Time-Trial Performance. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 463-470, Oct 2015.

Davis, JM; Alderson, NL; Welsh, RS. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2 Suppl, p. 573S-8S, Aug 2000.

Di Marco, G et al. Mesangial cells (MC), LLC-PK1 and inner medullary collecting duct (IMCD) cells are able to produce catecholamines "in vitro". **Journal of Hypertension**, v. 18, p. S66-S66, 2000.

Edge, J; Bishop, D; Goodman, C. Effects of chronic NaHCO₃ ingestion during interval training on changes to muscle buffer capacity, metabolism, and short-term endurance performance. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 101, n. 3, p. 918-25, Sep 2006.

Erlich, AT et al. Function of specialized regulatory proteins and signaling pathways in exercise-induced muscle mitochondrial biogenesis. **Integrative Medicine Research**, v. 5, n. 3, p. 187-197, Sep 2016.

Evans, WJ; Phinney, SD; Young, VR. Suction applied to a muscle biopsy maximizes sample size. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 14, n. 1, p. 101-2, 1982.

Fernandes, AL et al. Effect of time of day on performance, hormonal and metabolic response during a 1000-M cycling time trial. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109954, 2014.

Garcia-Roves, P et al. Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 104, n. 25, p. 10709-13, Jun 19 2007.

Gibala, MJ et al. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 α in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 106, n. 3, p. 929-34, Mar 2009.

Gleeson, M; Nieman, DC; Pedersen, BK. Exercise, nutrition and immune function. **Journal of Sports Sciences**, v. 22, n. 1, p. 115-25, Jan 2004.

Gollnick, PD; Piehl, K; Saltin, B. Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibres after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates. **Journal of Physiology-London**, v. 241, n. 1, p. 45-57, Aug 1974.

Gollnick, PD; Saltin, B. Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. **Clinical Physiology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, Feb 1982.

Granata, C et al. Sprint-interval but not continuous exercise increases PGC-1alpha protein content and p53 phosphorylation in nuclear fractions of human skeletal muscle. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44227, Mar 10 2017.

Hansen, AK et al. Skeletal muscle adaptation: training twice every second day vs. training once daily. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 1, p. 93-99, Jan 2005.

Hargreaves, M. Skeletal muscle metabolism during exercise in humans. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 3, p. 225-8, Mar 2000.

Harris, RC; Hultman, E; Nordesjo, LO. Glycogen, glycolytic intermediates and high-energy phosphates determined in biopsy samples of musculus quadriceps femoris of man at rest. Methods and variance of values. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation** v. 33, n. 2, p. 109-20, Apr 1974.

Havemann, L et al. Fat adaptation followed by carbohydrate loading compromises high-intensity sprint performance. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 100, n. 1, p. 194-202, Jan 2006.

Hawley, JA; Burke, LM. Carbohydrate Availability and Training Adaptation: Effects on Cell Metabolism. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 38, n. 4, p. 152-160, Oct 2010.

Hawley, JA; Morton, JP. Ramping up the signal: promoting endurance training adaptation in skeletal muscle by nutritional manipulation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 41, n. 8, p. 608-613, Aug 2014.

Heigenhauser, GJ; Sutton, JR; Jones, NL. Effect of glycogen depletion on the ventilatory response to exercise. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, v. 54, n. 2, p. 470-4, Feb 1983.

Holloszy, JO. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59 Suppl 7, p. 5-18, Dec 2008.

Holloszy, JO; Booth, FW. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 38, p. 273-91, 1976.

Hood, DA et al. Unravelling the mechanisms regulating muscle mitochondrial biogenesis. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 15, p. 2295-314, Aug 01 2016.

Hulston, CJ et al. Training with Low Muscle Glycogen Enhances Fat Metabolism in Well-Trained Cyclists. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 11, p. 2046-2055, Nov 2010.

Knuiman, P; Hopman, MTE; Mensink, M. Glycogen availability and skeletal muscle adaptations with endurance and resistance exercise. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, Dec 21 2015.

Koh, JH et al. PPARbeta Is Essential for Maintaining Normal Levels of PGC-1alpha and Mitochondria and for the Increase in Muscle Mitochondria Induced by Exercise. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1176-1185 e5, May 2 2017.

Lane, SC et al. Effects of sleeping with reduced carbohydrate availability on acute training responses. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 6, p. 643-655, Sep 15 2015.

Lima-Silva, AE et al. Effects of a low- or a high-carbohydrate diet on performance, energy system contribution, and metabolic responses during supramaximal exercise. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 38, n. 9, p. 928-34, Sep 2013.

Little, JP et al. An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1alpha and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 6, p. R1303-10, Jun 2011.

Madrazo, JA; Kelly, DP. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 44, n. 6, p. 968-75, Jun 2008.

Marquet, LA et al. Enhanced Endurance Performance by Periodization of Carbohydrate Intake: "Sleep Low" Strategy. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 48, n. 4, p. 663-672, Apr 2016.

Medina, DL et al. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 3, p. 288-99, Mar 2015.

Narkar, VA et al. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. **Cell**, v. 134, n. 3, p. 405-15, Aug 8 2008.

Nawrocki, A; Gorski, J. Effect of plasma free fatty acid concentration on the content and composition of the free fatty acid fraction in rat skeletal muscles. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 9, p. 601-6, Sep 2004.

Olesen, J; Kiilerich, K; Pilegaard, H. PGC-1alpha-mediated adaptations in skeletal muscle. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 460, n. 1, p. 153-62, Jun 2010.

Park, JY et al. p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. **Circulation Research**, v. 105, n. 7, p. 705-12, 11 p following 712, Sep 25 2009.

Perry, CGR et al. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. **Journal of Physiology-London**, v. 588, n. 23, p. 4795-4810, Dec 1 2010.

Petibois, C et al. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports : the metabolism alteration process syndrome. **Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 83-94, 2003.

Pfaffl, MW et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Letters**, v. 26, n. 6, p. 509-15, Mar 2004.

Philp, A; Burke, LM; Baar, K. Altering endogenous carbohydrate availability to support training adaptations. **Nestlé Nutrition Institute Workshop Series**, v. 69, p. 19-31; discussion 31-7, 2011.

Pilegaard, H et al. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. **Journal of Physiology-London**, v. 541, n. 1, p. 261-271, May 15 2002.

Pilegaard, H et al. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 279, n. 4, p. E806-E814, Oct 2000.

Pilegaard, H; Saltin, B; Neufer, PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 546, n. Pt 3, p. 851-8, Feb 1 2003.

Psilander, N et al. Exercise with low glycogen increases PGC-1 alpha gene expression in human skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 4, p. 951-963, Apr 2013.

Saltin, B; Rowell, LB. Functional adaptations to physical activity and inactivity. **Federation Proceedings**, v. 39, n. 5, p. 1506-13, Apr 1980.

Scarpulla, RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiological Reviews - American Journal of Physiology**, v. 88, n. 2, p. 611-38, Apr 2008.

Scarpulla, RC; Vega, RB; Kelly, DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 9, p. 459-66, Sep 2012.

Schmittgen, TD; Livak, KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

Stellingwerff, T et al. Decreased PDH activation and glycogenolysis during exercise following fat adaptation with carbohydrate restoration. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 2, p. E380-8, Feb 2006.

Vandesompele, J et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.

Vega, RB; Huss, JM; Kelly, DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 5, p. 1868-76, Mar 2000.

Wang, YX et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. **Cell**, v. 113, n. 2, p. 159-70, Apr 18 2003.

Ye, J et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, Jun 18 2012.

Yeo, WK et al. Acute signalling responses to intense endurance training commenced with low or normal muscle glycogen. **Experimental Physiology**, v. 95, n. 2, p. 351-358, Feb 1 2010.

Yeo, WK et al. Skeletal muscle adaptation and performance responses to once a day versus twice every second day endurance training regimens. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, n. 5, p. 1462-1470, Nov 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Capítulo de livro intitulado *Treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular*. In: Aptidão aeróbia: desempenho esportivo, saúde e nutrição. 1 ed. Barueri: Manole, 2017, v.1, p. 461-476. ISBN 978-85-204-5035-2.

31

Treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular

Victor Souza

INTRODUÇÃO

O papel da disponibilidade de substrato energético para a promoção de adaptações ao exercício tem sido uma importante área para pesquisas dentro da fisiologia do exercício. Acredita-se que a disponibilidade de carboidratos como substrato para o metabolismo muscular e suporte ao sistema nervoso central seja um fator crítico no desempenho de exercícios prolongados submáximos (>90 min) ou intermitente de alta intensidade¹⁵. Consequentemente, uma variedade de esportes é amplamente dependente de carboidratos como combustível, incluindo aqueles de *endurance* conduzidos em uma zona entre o segundo limiar metabólico e o consumo máximo de oxigênio (VO₂máx), e jogadores de esportes coletivos que realizam repetidas ações de exercícios de alta intensidade intercaladas por breves pausas⁶. Entretanto, é importante notar que o estoque total de carboidratos é limitado, sendo com frequência substancialmente menor que os requerimentos de energia para várias sessões de treinamento e competições realizadas por esses atletas.

Dessa forma, os nutricionistas esportivos promovem uma variedade de estratégias para agudamente no intuito de aumentar a disponibilidade desse substrato para uma sessão de treino, onde tem sido amplamente demonstrado na literatura que um aporte de carboidratos alguns dias antes da prova (3 a 5 dias) ocasiona uma supercompensação do glicogênio muscular, bem como a ingestão de carboidratos durante a prova aumenta o desempenho^{18,22,25}. De maneira análoga, acredita-se que a maior ingestão de carboidratos durante os treinamentos permitirá ao atleta treinar em maior intensidade e maior volume e, assim, obter respostas de maior magnitude ao treinamento. Entretanto, esse argumento não pode ser considerado uma questão duradouramente resolvida, pois não se está completamente elucidado se o que inicia as adaptações ao treinamento é a ausência ou o excesso de substrato disponível⁸.

O treinamento de *endurance* induz a diversas adaptações que levam ao aumento do desempenho, tais como o aumento do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ e o prolongamento do tempo de exaustão para uma determinada carga de trabalho, sendo essas adaptações relacionadas parcialmente a fatores intramusculares³¹. A diversidade de adaptações que ocorrem com o treinamento incluem um aumento no número de capilares², um aumento do volume e densidade mitocondrial com a elevação da atividade de enzima como a 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HAD) e citrato sintase (CS)^{13,16}, um aumento na concentração de proteínas transportadoras¹⁹ e um aumento na ocorrência de fibras do tipo IIA em decorrência das fibras do tipo IIX³. Consequentemente, a habilidade de metabolizar predominantemente gordura é aumentada¹³, o que pouparia glicogênio muscular para uma mesma carga de trabalho absoluta.

Interessantemente, ao observar essas adaptações ao treinamento em uma visão mais molecular, é possível observar que essas adaptações são consequência da acumulação de proteínas específicas, onde a expressão gênica que permite a alteração nas concentrações dessas proteínas é essencial para o início das adaptações¹⁴. Adicionalmente, tem sido demonstrado que a concentração de glicogênio muscular é um fator determinante para a transcrição de alguns genes. Realizar exercício com uma reduzida concentração de glicogênio muscular resulta em elevada transcrição de interleucina-6²³, piruvato desidrogenase quinase 4¹¹ e hexoquinase²⁹ quando comparado às situações onde as concentrações de glicogênio muscular são elevadas ou normais antes do início do exercício. O mecanismo para explicar o papel do glicogênio muscular na transcrição gênica pode ser explicado pelo fato de que diversos

fatores de transcrição incluem domínios ligados ao glicogênio. Quando o glicogênio muscular está baixo, esses fatores são liberados e se tornam livres para se associar com diferentes proteínas alvos^{4,10,30}. Portanto, recentes evidências científicas sugerem que o treinamento de *endurance* realizado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular poderá promover um aumento na magnitude das respostas adaptativas ao treinamento em comparação com situações em que o conteúdo de glicogênio muscular esteja normal ou elevado.

MANEIRAS DE INDUZIR A REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR

Existe um grande número de estratégias para reduzir a disponibilidade de carboidratos para o ambiente de treinamento, e deve-se salientar que essas estratégias nem sempre derivam de uma dieta com baixo conteúdo de carboidratos por si só, nem restringem a disponibilidade de carboidratos para todas as sessões de treinamento⁶. É importante salientar que, em diversos estudos, essas estratégias podem ser realizadas de maneira combinada. A dieta com baixa redução de carboidratos realizada cronicamente proporciona a redução da disponibilidade de carboidratos no músculo (carboidratos advindos de fontes endógenas e, principalmente, fontes exógenas) para todas as sessões de treinamento⁶.

Por sua vez, a realização de dois protocolos de treinamento no mesmo dia, com demasiada proximidade entre as sessões, promove uma baixa disponibilidade de carboidratos endógenos (p. ex., glicogênio muscular) por meio da limitada duração e baixo consumo de carboidratos no curto período de recuperação após a primeira sessão de treinamento⁶. Essa estratégia reduz a disponibilidade de carboidratos endógenos e exógenos para o músculo durante a segunda sessão de treinamento. A realização de uma sessão de treinamento após uma noite em jejum acarreta a redução da disponibilidade de carboidratos exógenos para o músculo durante a sessão de treino específica. Adicionalmente, essa estratégia promove uma redução na disponibilidade de carboidratos endógenos caso haja uma inadequada restauração dos estoques de glicogênio muscular em dias anteriores ao treinamento⁶.

A utilização da estratégia de reter a ingestão de carboidratos durante as primeiras horas de recuperação poderia promover uma inadequada disponibilidade de combustível para a sessão específica de treinamento, contudo, amplificaria as vias de sinalização celular após o exercício por causa do tempo curto de baixa disponibilidade de carboidratos⁶. Adicionalmente, essa estratégia poderia interferir no reabastecimento para as sessões de treinamentos

subsequentes se o consumo de carboidratos fosse reduzido ao invés de apenas adiado. Assim, essa retenção no consumo de carboidratos imediatamente após o exercício limitaria a taxa de síntese de glicogênio muscular²¹. Similarmente, o retardo no consumo de carboidratos poderia reduzir o potencial de armazenamento de glicogênio entre duas sessões (período de recuperação menor que 8 horas), independentemente da concentração de carboidratos consumidos⁶.

ADAPTAÇÕES CRÔNICAS ^{AO} TREINAMENTO COM REDUZIDO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR

A redução na disponibilidade de carboidratos altera dramaticamente o metabolismo. A redução no conteúdo de glicogênio muscular com o exercício ocorre concomitantemente com o aumento da oxidação de ácidos graxos, sugerindo que o baixo conteúdo de glicogênio leve à mudança da utilização de carboidratos para a utilização de ácidos graxos²⁸. Adicionalmente, a redução no conteúdo de glicogênio muscular pode estar diretamente envolvida em adaptações celulares ao treinamento pelo controle de vias de sinalização dentro do músculo ativo.

O recente interesse em se estudar os efeitos da redução do conteúdo de glicogênio muscular iniciou-se após o estudo de Hansen et al.¹⁴. Nesse estudo, sete homens não treinados realizaram um programa de dez semanas de treinamento com exercícios de extensão de joelho (*leg-kicking*). Dentro desse programa de treinamentos, o sujeito realizou com cada perna o mesmo trabalho muscular (5 h/semana), contudo elas receberam uma diferente programação diária: uma foi treinada duas vezes no mesmo dia (*low-leg*), enquanto a perna contralateral foi treinada diariamente (*high-leg*). O consumo de uma dieta rica em carboidrato (~ 8 g/kg/dia) permitiu que a perna *high* tivesse uma completa recuperação do glicogênio muscular a cada dia, enquanto a perna *low* iniciasse a segunda sessão com os estoques de glicogênio muscular deletados (~ 40% reduzido). Comparado com a perna *high*, a perna que treinou duas vezes no mesmo dia teve um aumento mais pronunciado no conteúdo de glicogênio muscular de repouso (quando o treinamento e a dieta são organizados para promover o reabastecimento energético), na atividade das enzimas CS e HAD, e nas concentrações plasmáticas de catecolaminas. Adicionalmente, embora a potência máxima tenha sido similar entre ambas as pernas, o tempo de exaustão para exercício a 90% da potência máxima de uma perna foi aumentado em quase 100% no caso da perna *low*.

Entretanto, apesar de apresentar resultados instigantes, uma variedade de questões não permitiu que os cientistas fossem categóricos em recomendar o treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular para atletas de *endurance*^{20,28,35}. Primeiramente, os sujeitos da investigação de Hansen et al.¹⁴ eram indivíduos não treinados e, portanto, não se sabia se a realização de treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular iria causar aumento nas adaptações e no desempenho de atletas. Segundo, os participantes do referido estudo realizaram uma quantidade fixa de trabalho em cada sessão de treino, embora uma condição de alto conteúdo de glicogênio muscular permitisse exercitar-se mais e/ou em intensidades mais elevadas. Terceiro, o modo de treinamento realizado (*leg-kicking* com apenas uma única perna) tem pouca semelhança com o modo de treinamento realizado pela maioria dos atletas durante as competições, ou seja, o tipo de treino não condiz com uma situação competitiva no mundo real. Finalmente, diversos autores sugerem que esse calendário de treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular realizado cronicamente pudesse induzir a uma situação de *overtraining*, lesões e redução na capacidade de treinamento de atletas de alto rendimento^{20,28,35}.

Objetivando a extrapolação desses achados para uma situação mais real, Yeo et al.³⁵ e Hulston et al.²⁰ propuseram um modelo similar de treinamento usando ciclistas e triatletas altamente treinados e exercício com maior massa muscular envolvida. Nesses estudos, os atletas foram divididos em dois grupos e cada grupo realizou dezoito sessões de treinamento em um período de três semanas. O grupo controle (*high*) treinou 6 dias/semana, durante três semanas, alternando entre 100 minutos de treinamento aeróbico em carga constante ($\sim 70\% \text{VO}_{2\text{pico}}$) em um dia e treinamento intervalado de alta intensidade no outro (8 séries de 5 min de esforço máximo com 1 min de recuperação entre as séries). Durante as 24 horas de recuperação entre as sessões de treino, o grupo *high* recebeu uma dieta visando reestabelecer os estoques de glicogênio muscular. Em contraste, o grupo experimental (*low*) treinou duas vezes no mesmo dia, realizando o treino aeróbico pela manhã, seguido de 2 horas de recuperação e, logo depois, realizaram o treinamento intervalado de alta intensidade. Similarmente ao estudo de Hansen et al.¹⁴, o treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular apresentou aumento de maior magnitude na atividade das enzimas CS, HAD e citocromo c oxidase subunidade IV (COX IV), além de uma tendência de aumento da atividade da enzima FAT/CD36 quando comparado ao treinamento com conteúdo de glicogênio

muscular normal. Adicionalmente, após o treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular, houve uma significativa diminuição na taxa de oxidação de carboidratos e aumento na oxidação de lipídios, principalmente em virtude de um aumento na taxa de oxidação de triglicerídeos intramuscular durante 60 min de exercício de carga constante (70% $\text{VO}_{2\text{máx}}$). Entretanto, apesar do aumento no desempenho em uma prova contrarrelógio de 60 minutos, não foram encontradas diferenças significativas na magnitude de aumento entre os grupos.

Conjuntamente, essas evidências permitem afirmar que as sessões de treinamento realizadas com reduzida concentração de glicogênio muscular podem aumentar a magnitude de adaptações metabólicas associadas ao treinamento, mesmo em indivíduos altamente treinados^{6,28}. Contudo, cabe ressaltar que, nesses estudos, apesar das elevadas respostas adaptativas ao treinamento, a intensidade da segunda sessão de treinamento realizada com conteúdo de glicogênio muscular baixo foi significativamente reduzida em comparação com o treinamento com estoques de glicogênio muscular normais^{20,35}. Adicionalmente, os protocolos que induziram a depleção do conteúdo de glicogênio muscular foram realizados preferencialmente duas horas antes da segunda sessão de treino, o que pode ser apontado como uma deficiência metodológica, pois também não se permite isolar se as respostas produzidas na segunda sessão de treino ocorrem como efeito da redução no conteúdo do GM ou da realização de duas sessões de treino com demasiada proximidade.

É curioso que aumentos metabólicos não sejam traduzidos em melhora no desempenho. Razões para essa aparente discrepância incluem: a brevidade dos períodos de estudo, a possibilidade que o desempenho não seja direta ou quantitativamente relacionados aos marcadores que tenham sido mensurados, a falha na mensuração de outros marcadores contraprodutivos, ou ainda, a comum falha dos cientistas esportivos em focar em adaptações musculares e ignorar as contribuições do sistema nervoso central para o desempenho⁶.

TREINAMENTO COM REDUZIDO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR: POSSÍVEIS MECANISMOS

A redução no conteúdo de glicogênio muscular provocado pelo exercício ocorre concomitantemente com o aumento da oxidação de ácidos graxos, sugerindo que a redução do glicogênio muscular seja diretamente responsável pela alteração do metabolismo corporal, passando da oxidação de carboidra-

tos para a oxidação de lipídios. Adicionalmente, a redução do conteúdo de glicogênio muscular está diretamente relacionada a adaptações celulares ao treinamento.

A manipulação dos estoques de glicogênio muscular cria um número de alterações que, juntas, provavelmente suportam o aumento das respostas adaptativas ao treinamento. Essas alterações incluem alterações na atividade do sistema nervoso simpático, como ocasionado pelo aumento da concentração plasmática de catecolaminas¹⁴, mudanças na atividade de proteínas que contêm domínios ligados ao glicogênio, tal qual as enzimas CS e HAD^{14,20,35}, e alterações no metabolismo de carboidratos e lipídios^{20,35}. Coletivamente, esses resultados indicam que o exercício de alta intensidade realizado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular aumenta a capacidade de oxidação de ácidos graxos em relação ao treinamento com níveis normais de glicogênio muscular²⁸.

Os componentes-chave para esse paradigma são o coativador da transcrição gênica PGC-1 α , a proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK) e o receptor ativado pelo proliferador peroxissomo α e δ (PPAR α e PPAR γ). O PGC-1 α é um coativador dos fatores de transcrição envolvidos na biogênese mitocondrial e metabolismo de lipídios. O AMPK é ativado pelo estresse metabólico, e agudamente controla a taxa de metabolismo de lipídios por meio da regulação de malonil-CoA e, em longo prazo, altera a transcrição de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e metabolismo lipídico. As PPAR são fatores de transcrição ativados pelos ácidos graxos que, com a PGC-1 α , controla a expressão de enzimas do metabolismo de ácidos graxos.

O exercício realizado com reduzido conteúdo de glicogênio muscular é percebido pelo corpo como um grande agente estressor, resultando na elevação dos níveis de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) circulantes, que podem afetar as respostas adaptativas ao treinamento de duas maneiras²⁸. Primeiro, catecolaminas afetam as respostas adaptativas por meio da fosforilação e ativação da proteína ligada à resposta do AMPc (CREB). O exercício então aumenta o estado de ativação da CREB tanto nos músculos ativos quanto nos demais músculos por causa da elevada atividade do sistema nervoso simpático³³. Um dos alvos da CREB é a PGC-1 α ¹. Dessa forma, as catecolaminas atuam por meio de receptores beta-adrenérgicos, podendo ter um papel significativo no aumento da oxidação de ácidos graxos, seguido do treinamento de *endurance* em estado de glicogênio depletado. A segunda maneira pela qual

as catecolaminas alteram as repostas adaptativas ao treinamento é por alterações no metabolismo de lipídios pela ativação da lipase sensível ao hormônio (HSL) que é fosforilada por meio da proteína quinase A (PKA). O aumento da atividade da HSL proporciona um aumento da lipólise no músculo e no tecido adiposo, havendo assim uma maior disponibilidade de ácidos graxos livres para o músculo durante o exercício, resultando no aumento da oxidação de ácidos graxos para a geração de energia e consequente aumento da atividade das PPAR, que são fatores de transcrição ativados pela ligação com ácidos graxos. No músculo, as PPAR alfa e gama, juntamente com a PGC-1 α , ligam-se aos promotores de enzimas-chave do metabolismo de lipídios, incluindo carnitina palmitol transferase 1 (CPT1), a enzima translocadora de ácidos graxos (FAT/CD36) e a própria HSL²⁸.

O exercício de *endurance* de alta intensidade aumenta a atividade da alfa2-AMPK, tanto basal quanto pós-exercício, em situações nas quais o conteúdo de glicogênio muscular está reduzido³⁴. Adicionalmente, a translocação nuclear de alfa2-AMPK tem sido sugerida como um importante fator de regulação de dois importantes fatores de transcrição: MEF2 (*myocyte-enhance fator 2*) e NRF1 (*nuclear respiratory fator 1*). Ambos possuem papel relevante no controle de uma variedade de genes para tipo de fibra, metabolismo de carboidratos e biogênese mitocondrial²⁴. Entretanto, Hulston et al.²⁰ demonstraram que o aumento induzido pelo treinamento na proteína GLUT4 foi atenuado quando o treinamento ocorreu com reduzido conteúdo de glicogênio muscular, sugerindo que a AMPK sozinha não tenha efeito no treinamento com conteúdo de glicogênio muscular reduzido.

O estudo farmacológico de Narkar et al.²⁶ pode ajudar a esclarecer como o treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular pode afetar enzimas do metabolismo lipídico. Esses autores sugerem que treinando ratos na esteira com adicional ingestão de GW1516, uma droga que ativa a PPAR γ , resultou no aumento na capacidade de utilizar lipídios como combustível, por meio do aumento da CPT1, FAT/CD36 e lipase lipoproteica. Interessantemente, quando este composto GW foi ingerido sozinho, ou seja, sem a realização do exercício, não houve efeito no metabolismo lipídico. Por outro lado, quando o composto GW foi ingerido com Aicar, uma droga que ativa a AMPK, os autores observaram um aumento da atividade de enzimas do metabolismo lipídico. Os autores também observaram uma direta interação entre alfa2-AMPK e PPAR γ , além de que a atividade da AMPK e PPAR poderia

ser aumentada pela PGC-1 α . Coletivamente, esses resultados sugerem que a PPAR γ interaja com a AMPK e PGC-1 α para aumentar a atividade de enzimas do metabolismo lipídico²⁸.

Em síntese, os possíveis mecanismos que explicariam as adaptações musculares induzidas pelo treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular são: 1) o exercício com reduzido conteúdo de glicogênio muscular aumenta a concentração de catecolaminas circulantes; 2) as catecolaminas levam a aumento na transcrição de PGC-1 α , resultando no aumento da concentração de PGC-1 α em sua forma mais ativa dentro do músculo; 3) as catecolaminas levam a um aumento na quebra de triglicerídeos a ácidos graxos livres, resultando em um aumento da concentração de ácidos graxos livres no plasma; 4) esse aumento da concentração de ácidos graxos livres e da quebra de triglicerídeos intramuscular resulta em aumento do consumo e oxidação de ácidos graxos; 5) esse aumento no consumo e oxidação de ácidos graxos resulta em aumento da ativação das PPAR α e γ ; 6) o exercício de alta intensidade em estado de glicogênio muscular depletado aumenta a atividade da AMPK; 7) juntos, esse aumento da PGC-1 α , PPAR e AMPK promove o aumento da expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico; 8) quando cronicamente, esses resultados levam ao aumento da capacidade de se utilizar gordura como fonte de energia em exercícios submáximos, poupando glicogênio muscular, e potencialmente elevando a capacidade de exercício (Figura 31.1).

APLICAÇÕES PRÁTICAS: "TREINAR BAIXO, COMPETIR ALTO"

Claramente, as adaptações musculares alcançadas pelo treinamento são uma importante parte da melhora do desempenho atlético. Entretanto, mudanças na fisiologia muscular ou marcadores do metabolismo celular não são, por si, facilitadores do desempenho. Portanto, não é surpreendente que os benefícios do treino com reduzido conteúdo do glicogênio muscular tenham gerado excitação dentro da comunidade esportiva. Infelizmente, há evidências de não entendimento dos princípios e da prática do treinamento *low* por parte dos atletas, treinadores e até mesmo cientistas esportivos²⁸.

Contudo, parece haver um mal entendimento da ideia do estudo proposto por Hansen et al.¹⁴, em que a implementação de uma dieta com restrição de carboidratos não é feita pela exposição de um ambiente com baixo conteúdo de carboidratos em todas as sessões de treino. De fato, o protocolo adotado por

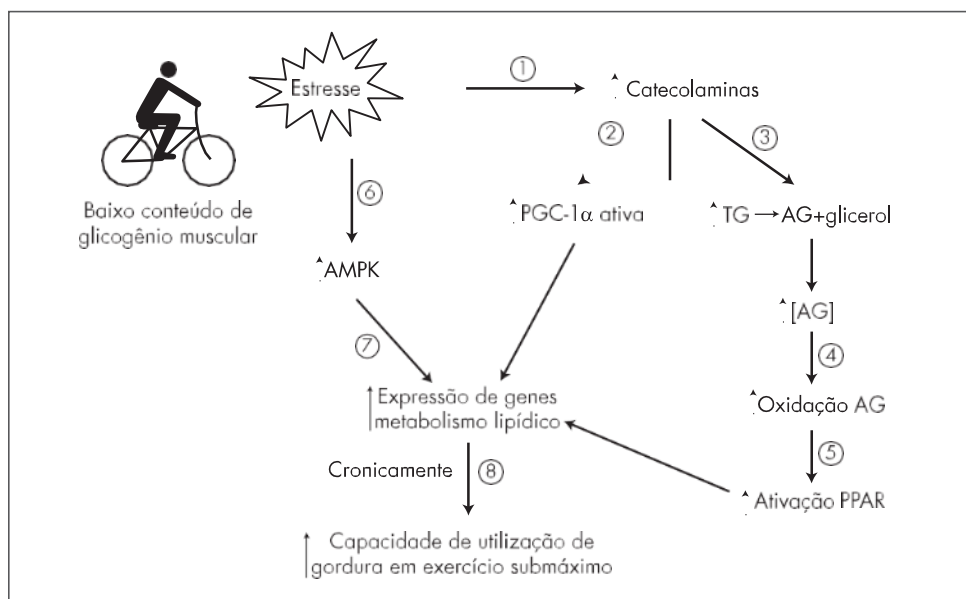


Figura 31.1 Mecanismos das adaptações musculares induzidas pelo treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular. 1) O exercício aumenta a concentração de catecolaminas circulantes; 2) as catecolaminas aumentam a concentração de PGC-1 α em sua forma mais ativa dentro do músculo; 3) as catecolaminas levam a um aumento da concentração de AG livres no plasma; 4) o aumento da concentração de AG livres resulta em aumento da oxidação de AG; 5) esse aumento na oxidação de AG resulta em aumento da ativação das PPAR; 6) o exercício de alta intensidade em estado de glicogênio muscular depletado aumenta a atividade da AMPK; 7) juntos, esse aumento da PGC-1 α , PPAR e AMPK promove o aumento da expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico; 8) quando cronicamente, esses resultados levam ao aumento da capacidade de se utilizar gordura em exercícios submáximos. TG: triglicerídeos; AG: ácidos graxos.

Hansen et al.¹⁴ e pelos demais estudos que o seguiram^{20,35} têm envolvido os programas de treinamento com duas sessões de treino no mesmo dia, sendo a segunda sessão realizada no mesmo dia, poucas horas após a primeira, assegurando um reabastecimento mínimo de glicogênio muscular durante o período de recuperação. A segunda sessão de treino é iniciada com aproximadamente 40% menos de glicogênio muscular^{14,35}. Entretanto, após esta sessão, há a ingestão de uma dieta com alto conteúdo de carboidratos com o intuito de obter uma supercompensação do glicogênio muscular e os atletas iniciarem a sessão de depleção seguinte com os estoques de glicogênio muscular já reestabelecidos.

Outros estudos têm usado diferentes protocolos para se induzir a redução do conteúdo de glicogênio antes do início da segunda sessão de treino.

Por exemplo, a realização do exercício após uma noite de jejum; a ingestão de água durante períodos de treinos prolongados; períodos livres de carboidratos nas horas após o exercício; ou, ainda, o consumo de carboidratos abaixo do idealizado para determinada carga de treino⁶. Interessantemente, o exercício em estado de jejum prolongado tem sido utilizado para promover diferentes respostas de sinalização celular ao exercício realizado com o consumo de carboidratos antes e durante a sessão⁷. Conjuntamente, essas informações suportam o protocolo descrito “treinar baixo, competir alto” – em que o treinamento realizado com baixa disponibilidade de glicogênio muscular aumentaria as respostas adaptativas ao treinamento, enquanto que competindo em alta disponibilidade de combustível poderia haver um aumento no desempenho⁶.

Portanto, o modelo de treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular pode ser uma estratégia importante para manutenção da saúde, por exemplo, para indivíduos que apresentam síndrome metabólica, pois treinar com baixo conteúdo de glicogênio muscular poderia ser uma alternativa para aumentar a oxidação de lipídios e, conseqüentemente, reduzir os riscos ligados à obesidade. Adicionalmente, treinar com reduzidas concentrações de glicogênio muscular durante a pré-temporada pode ser uma alternativa para atletas gerarem maiores adaptações nesse período específico do calendário de treinamento e formar a base para o período competitivo.

Entretanto, a possibilidade de que protocolos de treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular possam reduzir a capacidade de treinar em altas intensidades requer atenção. Muitos técnicos descrevem programas de treinamento em quais os atletas são requeridos a trabalhar em intensidades específicas acima dos seus “*pacing* de prova”, onde o sucesso de muitos esportes é definido pela velocidade do *sprint* final. Intuitivamente, sacrificando a capacidade de treinar em altas intensidades deveria ser feita com cautela por parte dos treinadores até que mais evidências possam ser mostradas de que esse tipo de estratégia não prejudica o desempenho²⁸.

Adicionalmente, lacunas metodológicas podem estar interferindo nessa não transferência do aumento das adaptações para o aumento no desempenho. Alguns protocolos^{14,20,35} que induziram a depleção do conteúdo de glicogênio muscular foram realizados preferencialmente duas horas antes da segunda sessão de treino, o que pode ser apontado como uma deficiência metodológica, pois também não se permite isolar se as respostas produzidas na segunda sessão de treino ocorrerem como efeito da redução no conteúdo

do glicogênio muscular ou da realização de duas sessões de treino com demasiada proximidade. Portanto, futuras investigações são requeridas para determinar se esse aumento das adaptações do treinamento é resultado direto do treino com baixa disponibilidade de glicogênio muscular ou simplesmente o efeito de treinar duas vezes no mesmo dia.

Muito embora a discussão dos efeitos crônicos do treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular esteja focada nos benefícios, é importante considerar os efeitos colaterais dessa estratégia²⁸. Existe a possibilidade de que essa alta regulação da utilização de lipídios durante o exercício esteja associada à desregulação da utilização de carboidratos. De fato, em adaptações, a dieta hiperlipídica para aumentar a carga de carboidratos durante eventos de *endurance*, poupando glicogênio muscular durante o exercício, aparece agora como resultado do uso inapropriado de glicogênio muscular por causa da redução da atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH), ocasionando a diminuição da entrada de carboidratos no Ciclo de Krebs³². Essa falha na oxidação de carboidratos pode impedir a sustentação de altas intensidades durante eventos de *endurance*¹⁷. Adicionalmente, a magnitude das respostas de hormônios do estresse (adrenalina e cortisol) e citosinas (IL-6, IL-1ra e IL-10) são significativamente maiores quando indivíduos realizam cronicamente treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio do que em situações em que o conteúdo de glicogênio muscular é normal, tendo sido especulado que os atletas que treinam cronicamente com essa deficiência de carboidratos estão se colocando em risco pelo efeito imunossupressor do cortisol, incluindo a supressão da produção de anticorpos, proliferação de linfócitos e a morte natural de células com atividades citotóxicas¹². Ademais, a redução crônica do conteúdo de glicogênio pode causar sintomas como sonolência, função perceptiva e cognitiva prejudicada e transtorno de afetividade, que são considerados sintomas da fadiga do sistema nervoso central⁹. Finalmente, o efeito de se treinar repetidamente com reduzido conteúdo de glicogênio muscular pode aumentar o risco de doenças¹², lesões⁵ e *overtraining*²⁷, que também precisam ser considerados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, recentes evidências permitem afirmar que as sessões de treinamento realizadas com reduzida concentração de glicogênio muscular aumentam a magnitude de adaptações metabólicas associadas ao treinamento,

tanto em indivíduos não treinados quanto altamente treinados. Por outro lado, essas elevadas adaptações não são traduzidas em melhora no desempenho. A possibilidade de que protocolos de treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular possam reduzir a capacidade de treinar em altas intensidades também requer atenção por parte dos atletas e treinadores, para que os possíveis efeitos colaterais dessa estratégia possam ser minimizados.

Adicionalmente, os protocolos que induziram a depleção do conteúdo de glicogênio muscular foram realizados preferencialmente duas horas antes da segunda sessão de treino, o que pode ser apontado como uma deficiência metodológica, pois também não se permite isolar se as respostas produzidas na segunda sessão de treino ocorrerem como efeito da redução no conteúdo do GM ou da realização de duas sessões de treino muito próximas. Portanto, futuras pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos responsáveis por essas adaptações ao treinamento com reduzido conteúdo de glicogênio muscular e determinar se essas adaptações ao treinamento são resultado direto do treinamento com baixa disponibilidade de glicogênio muscular, ou simplesmente o efeito de treinar duas vezes no mesmo dia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akimoto T, Sorg BS, Yan Z. Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α promoter activity in skeletal muscles of living mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(3):C790-6.
2. Andersen P, Henriksson J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol*. 1977;270(3):677-90.
3. Andersen P, Henriksson J. Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. *Acta Physiol Scand*. 1977;99(1):123-5.
4. Armstrong CG, Browne GJ, Cohen P, Cohen PT. PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targetting subunits of protein phosphatase 1. *Febs Lett*. 1997;418(1-2):210-4.
5. Brouns F, Saris WH, Ten Hoor F. Nutrition as a factor in the prevention of injuries in recreational and competitive downhill skiing. *J Sports Med*. 1986;26(1):85-91.
6. Burke LM. Fueling strategies to optimize performance: training high or training low? *Scand J Med Sci Sports*. 2010;20(suppl 2):48-58.
7. Civitarese AE, Hesselink MK, Russell AP, Ravussin E, Schrauwen P. Glucose ingestion during exercise blunts exercise-induced gene expression of skeletal muscle fat oxidative genes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005(6);289:E1023-9.

8. Coyle EF. Physical activity as a metabolic stressor. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2 Suppl):512S-20S.
9. Davis JM, Alderson NL, Welsh RS. Serotonine and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(suppl):573S-8S.
10. Doherty MJ, Moorhead G, Morrice N, Cohen P, Cohen PT. Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen-binding (GL)-subunit of protein phosphatase-1. *Febs Lett.* 1995;375(3):294-8.
11. Furuyama T, Kitayama K, Yamashita H, Mori N. Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochem J.* 2003;375(Pt 2):365-71.
12. Gleeson M, Nieman DC, Pedersen BK. Exercise, nutrition and immune function. *J Sports Sci.* 2004;22(1):115-22.
13. Gollnick PD, Saltin B. Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clin Physiol.* 1982;2(1):1-12.
14. Hansen AK, Fischer CP, Plomgaard P, Andersen JL, Saltin B, Pedersen BK. Skeletal muscle adaptation: training twice every second day vs. training once daily. *J Appl Physiol.* 2005;98(1):93-9.
15. Hargreaves M. Metabolic responses to carbohydrate ingestion: effect on exercise performance. In: Lamb DR, Murray R. (Eds.) *Perspectives in exercise science and sports medicine. The metabolic basis of performance in exercise and sport.* Traverse City: Cooper Publishing Company; 1999. p. 93-124.
16. Hargreaves M. Skeletal muscle metabolism during exercise in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(3):225-8.
17. Havemann L, West SJ, Goedecke JH, Macdonald IA, ST Clair Gibson A, Noakes TD, et al. Fat adaptation followed by carbohydrate loading compromises high-intensity sprint performance. *J Appl Physiol.* 2006;100(1):194-202.
18. Helge JW, Kiens B. Muscle enzyme activity in humans: role of substrate availability and training. *Am J Physiol.* 1997;272(5Pt 2):R1620-4.
19. Holloszy JO, Booth FW. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol.* 1976;38:273-91.
20. Hulston CJ, Vennart MC, Mann CH, Martin C, Philp A, Baar K, et al. Training with low muscle glycogen enhances fat metabolism in well-trained cyclists. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(11):2046-55.
21. Hultman E, Bergstrom J. Muscle glycogen synthesis in relation to diet studied in normal subjects. *Acta Med Scand.* 1967;182(1):109-17.

22. Karlsson J, Saltin B. Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J Appl Physiol.* 1971;31(2):203-6.
23. Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J.* 2001;15(14):2748-50.
24. Mcgee SL, Sparling D, Olson AL, Hargreaves M. Exercise increases MEF2- and GEF DNA binding activity in human skeletal muscle. *Faseb J.* 2006;20(2):348-9.
25. Mitchell JB, Costill DL, Houmard JA, Flynn MC, Fink WJ, Beltz JD. Influence of carbohydrate ingestion on counterregulatory hormones during prolonged exercise. *Int J Sports Med.* 1990;11(1):33-6.
26. Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, et al. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell.* 2008;134(3):405-15.
27. Petibois C, Cazorla G, Poortmans JR, Déléris G. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports: the metabolism alteration process syndrome. *Sports Med.* 2003;33(2):83-94.
28. Philp A, Burke LM, Baar K. Altering endogenous carbohydrate availability to support training adaptations. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2011;69:19-31. Discussion 31-7.
29. Pilegaard H, Keller C, Steensberg A, Helge JW, Pedersen BK, Saltin B et al. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. *J Physiol.* 2002;541(Pt 1):261-71.
30. Printen JA, Brady MJ, Saltiel AR. PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science.* 1997;275(5305):1475-8.
31. Saltin B, Rowell LB. Functional adaptations to physical activity and inactivity. *Fed Proc.* 1980;39(5):1506-13.
32. Stellingwerff T, Spriet LL, Watt MJ, Kimber NE, Hargreaves M, Hawley JA et al. Decreased PDH activation and glycogenolysis during exercise following fat adaptation with carbohydrate restoration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290(2):E380-8.
33. Widegren U, Jiang XJ, Krook A, Chibalin AV, Bjornholm M, Tally M, et al. Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *Faseb J.* 1998;12(13):1379-89.
34. Wojtaszewski JF, Macdonald C, Nielsen JN, Hellsten Y, Hardie DG, Kemp BE, et al. Regulation of 5'AMP-activated protein kinase activity and substrate utilization in exercising human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E813-22.

35. Yeo WK, Paton CD, Garnham AP, Burke LM, Carey A, Hawley JA. Skeletal muscle adaptation and performance responses to once a day versus twice every second day endurance training regimens. *J Appl Physiol.* 2008;105(5):1519-26.

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)**

Convido o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), do estudo 2 “Adaptações agudas ao treinamento com conteúdo de glicogênio muscular reduzido” da pesquisa (*“ADAPTAÇÕES AGUDAS E CRÔNICAS AO TREINAMENTO COM CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR REDUZIDO”*).

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Sla 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740- 600, Tel.: 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Adaptações agudas e crônicas ao treinamento com conteúdo de glicogênio muscular reduzido.

Pesquisador Responsável: Carol Virgínia Góis Leandro.

Endereço/Telefone/e-mail para contato (inclusive ligações a cobrar): Laboratório de Fisiologia e Farmacologia. Departamento de Nutrição. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE. CEP: 50670-901 ou Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte. Centro Acadêmico de Vitória. Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista. Vitória de Santo Antão/PE. CEP: 55608-680 / (81) 35233351/ carolleandro22@gmail.com.

Pesquisadores participantes: Victor Amorim Farias Andrade de Souza; Adriano Eduardo Lima da Silva.

Telefones para contato: (81) 35233351

- Que o estudo se destina a entender como uma sessão aguda de treinamento com conteúdo de glicogênio muscular reduzido melhora o desempenho no exercício físico;
- Que a importância deste estudo é investigar as adaptações agudas causadas treinamento em diferentes estratégias de redução do conteúdo de glicogênio muscular. Adicionalmente, as estratégias utilizadas no estudo são importantes para manutenção da saúde, por exemplo, para indivíduos que apresentam síndrome metabólica, pois treinar com baixo conteúdo de GM poderia ser uma alternativa para aumentar a oxidação de lipídios e consequentemente reduzir os riscos ligados à obesidade; e podem ser uma alternativa para gerar maiores adaptações durante o período de pré-temporada e formar a base para o período competitivo.

- Que esse estudo começará em Julho de 2014, com previsão de termino para Dezembro de 2015, mas eu estou ciente que a minha participação resume-se a sete visitas ao laboratório.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: Eu deverei visitar o laboratório de Fisiologia do Exercício do Centro Acadêmico de Vitória, CAV/UFPE, sete vezes. Na primeira visita, serei submetido a teste incremental até a exaustão onde os pesquisadores aumentam a intensidade do esforço a cada quatro minutos até eu não conseguir mais pedalar ou pedir para interromper o teste. Este teste terá a duração de 30 minutos. Setenta e duas horas após o teste incremental, eu realizarei os seguintes protocolos, separados por aproximadamente uma semana: 1) uma sessão de treino para redução do estoques de glicogênio muscular na manhã de um dia e uma sessão de treino intervalado na manhã seguinte do outro, com um período de 22-24 h de recuperação entre as sessões, onde neste período de recuperação irei consumir duas refeições contendo 80 % CHO, 10 % lipídios e 10 % proteínas; 2) uma sessão de treino para redução do estoques de glicogênio muscular na manhã de um dia e uma sessão de treino intervalado na manhã seguinte do outro, com um período de 22-24 h de recuperação entre as sessões, onde neste período de recuperação irei consumir duas refeições contendo 6,5 % CHO, 83,5 % lipídios e 10 % proteínas; 3) uma sessão de treino para redução do estoques de glicogênio muscular e uma sessão de treino intervalado realizadas pela manhã, no mesmo dia, separadas por um período de 2h, onde neste período de recuperação irei consumir somente água. Cada uma dessas sessões terá duração de aproximadamente 90 minutos.
- Eu fui informado que os testes ou treinamentos poderão ser interrompidos por decisão dos pesquisadores ou caso eu me sinta cansado e indisposto.
- Eu fui informado que antes, imediatamente após e três horas após a sessão de treino intervalado, irei realizar um micro biópsia do músculo *vastus lateralis*, com anestesia local, utilizando a técnica de agulha de biópsia subcutânea com sucção. O procedimento de biopsia muscular será realizado por um médico experiente, que já realiza essas medidas rotineiramente. Antes do procedimento de retirada de 40-50 mg de massa muscular, o médico anestesiará a pele e a fáscia sobrejacente ao músculo usando 1 % de xilocaína.
- Eu fui informado que antes, imediatamente após e três horas após a sessão de treino intervalado, serão coletados amostras de 15 mililitros de sangue venoso. Assim, antes do início do protocolo, um cateter será fixado na veia braquial com infusão periódica de salina estéril para evitar a coagulação e obstrução da passagem do sangue pelo cateter.
- Que existe risco quanto à realização da coleta de sangue e da biópsia muscular, mas que os pesquisadores irão adotar todos os procedimentos conhecidos para amenizar esses riscos.
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: riscos de morte súbita por infarto do miocárdio, episódios vaso vagais, dor muscular e rigidez. No entanto, estes

eventos são extremamente raros ($< 0,1 \%$) e improvável quando os cuidados com a triagem e sintomas são tomadas antes e durante os testes. Além de desconforto, hematomas, contusões temporárias no local da biópsia, dor, dor tardia, sangramento, sensação alterada da localização da pele, tonturas e mal estar que possam ocorrer durante o teste.

- Que não existem outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: apesar de extremamente raros, caso eu tenha algum evento de mal súbito, haverá a presença do Médico responsável pela pesquisa, Dr. André Sansonio de Moraes, CRM: 15251-PE, bem como um desfibrilador no Centro Acadêmico de Vitória (CAV) onde as atividades serão efetuadas. Ademais, serei submetido a exames cardiológicos sob a supervisão do Médico responsável pelo acompanhamento da pesquisa antes de iniciar os testes. Além disto, eu serei transportado de ambulância pública ou de automóvel particular para o hospital publico mais próximo da Universidade, sendo responsável pelo transporte o professor Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva e/ou professora Dr.^a Carol Virgínia de Góis Leandro.
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: eu terei acesso a qualquer resultado referente ao meu teste e que poderei, a qualquer momento, esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável.
- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: O médico especializado irá realizar as coletas de tecido muscular, por meio da biópsia muscular e o professor responsável irá realizar os meus testes e eu estarei sendo monitorado por um monitor cardíaco durante todas as sessões.
- Que, sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Nome e Assinatura do pesquisador _____

Prof.^a Dr.^a Carol Virgínia Góis Leandro

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas, filmagens, etc), ficarão armazenados no computador do

Laboratório de Fisiologia do Exercício, sob a responsabilidade do pesquisador principal, no endereço acima informado, pelo período de no mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG: _____, CPF: _____, abaixo assinado, após a leitura deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Adaptações agudas e crônicas ao treinamento com conteúdo de glicogênio muscular reduzido” – Estudo 2, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

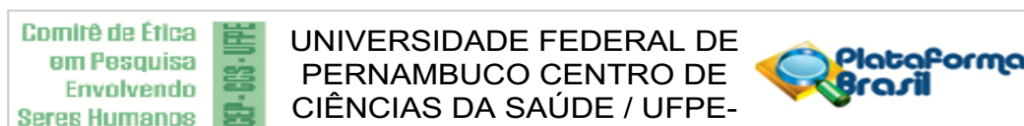
Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXOS

ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Adaptações agudas e crônicas ao treinamento com conteúdo de glicogênio muscular reduzido

Pesquisador: Victor Amorim Farias Andrade de Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30378414.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 728.899

Data da Relatoria: 19/06/2014

Apresentação do Projeto:

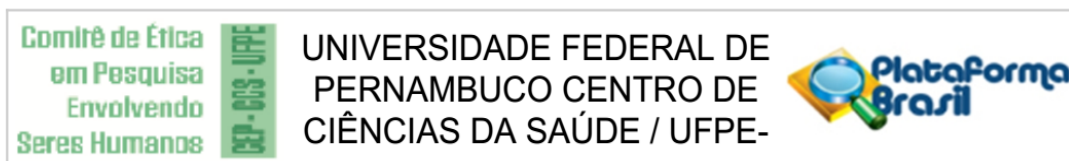
Trata-se de reposta as pendências da pesquisa em epígrafe a ser desenvolvida como tese do doutorado do Programa de Pós-Graduação em Nutrição desta Universidade Federal de Pernambuco, a qual conta com o apoio CNPq.

A pesquisa visa investigar se as respostas adaptativas agudas e crônicas ao treinamento realizado com baixa concentração de glicogênio muscular são causadas diretamente pela baixa disponibilidade de glicogênio ou pela realização de duas sessões de treinamento de ciclismo no mesmo dia. Para isso utilizará 3 grupos compostos por 10 pessoas cada um: um grupo com alto glicogênio muscular (um treinando por dia pela manhã), outro Baixo glicogênio muscular (um treinamento por dia) e outro Baixo glicogênio muscular duas vezes (dois treinamentos por dia). Inicialmente todos os participantes deverão realizar uma prova de esforço máximo para posterior determinar a carga de 90% do limiar aeróbio.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é de investigar se as respostas adaptativas agudas e crônicas ao treinamento realizado com baixa concentração de glicogênio muscular são causadas diretamente pela baixa disponibilidade de glicogênio ou pela realização de duas sessões de treinamento de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 728.899

ciclismo no mesmo dia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos aos indivíduos são os inerentes a atividade submetida aos participantes, incluindo "riscos de morte súbita por infarto do miocárdio, episódios vaso vagais, dor muscular e rigidez". Quanto à biópsia, esta será realizada por uma pessoa especializada para tal. Mas o projeto não prevê a permanência de um médico ou de desfibrilador cardíaco no local das atividades, e apenas uma ambulância para levar o pesquisador até o hospital se necessário. No TCLE estes riscos não estão bem detalhados, não existindo a advertência da morte súbita.

Como benefício, a pesquisa poderá contribuir para novas formas de treinamento físico de alta performance, e o conhecimento a respeito da bioquímica muscular frente ao exercício.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tratar-se de uma pesquisa com metodologia bem delineada, atendendo aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão anexados à Plataforma Brasil.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Quanto à solicitação da relatoria anterior referente à informação sobre o médico responsável, incluindo no projeto e no TCLE, bem como a carta de anuência do mesmo, o pesquisador atendeu as pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos	CEP - CCS - UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	-------------------------	---	---

Continuação do Parecer: 728.899

RECIFE, 25 de Julho de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS			
Bairro: Cidade Universitária		CEP: 50.740-600	
UF: PE	Município: RECIFE		
Telefone: (81)2126-8588	Fax: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br	