

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

Thaysa Ghiarone de Araujo Silva

**Adaptações moleculares, funcionais e morfológicas relacionadas ao
treinamento com baixo glicogênio muscular: treino duas vezes ao dia *versus*
treino diariamente**

**Recife
2018**

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

Thaysa Ghiarone de Araujo Silva

**Adaptações moleculares, funcionais e morfológicas relacionadas ao
treinamento com baixo glicogênio muscular: treino duas vezes ao dia *versus*
treino diariamente**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientador: Profº Drº Adriano Eduardo Lima da Silva

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:

bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S586a Silva, Thaysa Ghiarone de Araujo.

Adaptações moleculares, funcionais e morfológicas relacionadas ao treinamento com baixo glicogênio muscular: treino duas vezes ao dia *versus* treino diariamente / Thaysa Ghiarone de Araujo Silva. – Recife: o autor, 2018.

90 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Adriano Eduardo Lima da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em nutrição. Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Exercício. 2. Microscopia eletrônica de transmissão. 3. Mitocôndria. 4. Glicogênio. 5. Carboidrato. 6. Desempenho atlético. 7. Teste de esforço. I. Silva, Adriano Eduardo Lima da (orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 048)

Thaysa Ghiarone de Araujo Silva

Adaptações moleculares, funcionais e morfológicas relacionadas ao treinamento com baixo glicogênio muscular: treino duas vezes ao dia *versus* treino diariamente

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.

Tese aprovada em 26 de Fevereiro de 2018.

Banca examinadora:

Adriano Eduardo Lima da Silva, Doutor em Biodinâmica do Movimento Humano, UTFPR

Marcos David da Silva Cavalcante, Doutor em Biodinâmica do Movimento Humano, UFPE

Raquel da Silva Aragão, Doutora em Nutrição, UFPE

Diogo Antônio Alves De Vasconcelos, Doutor em Ciências (Fisiologia Humana), UFPE

André dos Santos Costa, Doutor em Biodinâmica do Movimento Humano, UFPE

*Dedico esse trabalho aos meus pais Ghiarone e Nice, com todo meu amor e gratidão,
por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

À minha família, meus pais Manuel Ghiarone e Claudenice Marinho e meus irmãos Rubens Eduardo e Maria Clara, obrigada pelo carinho, paciência e incentivo, meu agradecimento especial a vocês que se orgulham de mim e confiam em meu trabalho.

Ao meu esposo Kleiton Silva, meu amor e companheiro de vida, sempre esteve ao meu lado mesmo quando não possível fisicamente, por sua motivação companheirismo e generosidade.

Ao meu orientador Prof. Adriano Lima-Silva por acreditar em meu potencial, me permitido crescer e ser exemplo de profissional.

Aos meus amigos do Doutorado, especialmente aos amigos do GPCE , Thays, Sara, Ana Carla, Victor, Léo, Fabiano, Marcos, Rodrigo, Rafael e Guilherme, grupo que tenho grande orgulho de fazer parte.

Aos amigos de longa data que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

Aos colaboradores científicos no Brasil e na Austrália. Dr. André, Prof^a. Mariana, Prof^a. Karina, Prof^a. Regina, Prof. Yves, Prof^a. Carol, Prof^a. Raquel, Prof. David, Jujiao Kuang. Gratidão por todo trabalho e incentivo.

À Pós-graduação, Cecília, Andrea, Neci e Prof^a. Elizabeth por todo incentivo e auxílio.

Ao CNPQ e FACEPE, pelo suporte e financiamento.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. E, em especial, aos voluntários, pelo interesse e disposição em participar desse estudo.

Os meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O glicogênio desempenha uma importante função no metabolismo muscular. O treinamento de *endurance* com reservas reduzidas de glicogênio muscular pode maximizar a adaptação do metabolismo oxidativo e conseqüentemente melhorar o desempenho a longo prazo. Entretanto, apesar de nunca ter sido testado, parte dessa melhora poderia ser atribuída à estratégia para redução do glicogênio muscular, ao invés do menor conteúdo de glicogênio muscular *per se*. No presente estudo, foi avaliado se três semanas de dois tipos diferentes de estratégias de treinamento com baixo glicogênio muscular promovem diferentes adaptações moleculares, funcionais e morfológicas ligadas à biogênese mitocondrial. Para tal, quinze homens saudáveis foram divididos em dois grupos para treinar duas vezes ao dia (N=8) ou diariamente (N=7). O treino consistiu de exercício de *endurance* (depleção de glicogênio muscular) seguido por exercício intervalado com repouso entre os exercícios de 2 e 14h para duas vezes ao dia e diariamente, respectivamente. Para ambos os grupos foi mantida a mesma ingestão diária de carboidrato e total calórico, assim como o mesmo volume total de treino. Biópsias musculares, antropometria e teste de desempenho foram realizados pré e pós-treino. Após três semanas, os níveis musculares de PGC-1 α , complexos I-V, atividade da citrato síntase, conteúdo mitocondrial e lipídico intramusculares se mantiveram estáveis em ambos os grupos ($p>0,05$). Por outro lado, houve incremento na função mitocondrial apenas no grupo duas vezes ao dia com redução no estado 4 da respiração (pré: $4,5 \pm 0,8 \text{ nmolO}_2\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e pós $2,6 \pm 0,9 \text{ nmolO}_2\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), sem alteração no grupo diariamente (pré: $3,4 \pm 1,3 \text{ nmolO}_2\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e pós: $3,9 \pm 1,0 \text{ nmolO}_2\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (interação grupo x treino, $p<0,05$). Além disso, houve redução da massa corporal, gordura corporal, aumento do $\text{VO}_{2\text{max}}$ e potência máxima do teste incremental na mesma magnitude para os dois grupos ($p<0,05$). Por fim, houve redução na produção de lactato, custo de O_2 e percepção subjetiva do esforço (PSE) para os dois grupos, mas com maior redução da PSE para o grupo duas vezes ao dia (interação grupo x tempo x treino, $p<0,05$) no teste de carga constante pós-treino. Este estudo demonstrou que três semanas de treinamento com baixo glicogênio muscular resultou em adaptações ao treino semelhantes para os parâmetros antropométricos, parâmetros cardiorrespiratórios e

desempenho. Contudo, vale destacar que houve maior efeito na redução da PSE além de melhor eficiência mitocondrial no grupo duas vezes ao dia.

Palavras-chave: Exercício. Microscopia eletrônica de transmissão. Mitocôndria. Glicogênio. Carboidrato. Desempenho atlético. Teste de esforço.

ABSTRACT

Glycogen plays an important role in muscle metabolism. Endurance training by which reduced muscle glycogen reserves can maximize the adaptation of oxidative metabolism and improve performance. However, some of this improvement could be related to the strategy to reduce muscle glycogen, rather than muscle glycogen *per se*. Herein, it was evaluated whether three weeks of two different types of training strategies with low muscle glycogen promotes different molecular, functional and structural adaptations associated to mitochondrial biogenesis. Fifteen healthy men were divided into two groups, one group training twice a day (N=8) or another group to training daily (N=7), the training consisted of endurance exercise (muscle glycogen depletion) followed by exercise interval training, the rest between exercises were 2 and 14 h for twice a day and daily respectively. The same daily intake of carbohydrate and total caloric intake, as well as the same total volume of training was maintained between both groups. Muscle biopsies, anthropometry and performance testing were performed before and after training. Three weeks of exercise training remained stable muscle levels of PGC-1 α , complexes I-V and citrate synthase activity, with no change in mitochondrial and intramuscular lipid content ($p>0.05$). On the other hand, there was an increase in mitochondrial function only twice a day group with a reduction in state 4 respiration (pre: 4.5 ± 0.8 nmolO₂·mL⁻¹·min⁻¹ and post $2,6 \pm 0.9$ nmolO₂·mL⁻¹·min⁻¹), without change in daily group (pre: 3.4 ± 1.3 nmolO₂·mL⁻¹·min⁻¹ and post: 3.9 ± 1.0 nmolO₂·mL⁻¹·min⁻¹) (interaction group x training, $p<0.05$). In addition, there was reduction of body mass, body fat, increase in VO₂max and maximal power in incremental test for both groups, $p<0.05$. Finally, there was a reduction in lactate production, O₂ cost and rated perceived exertion (RPE) for both groups, with a greater reduction of RPE for the twice a day group (interaction group x time x training, $p<0.05$) at constant load test. This study demonstrated that three weeks of low muscle glycogen training resulted in similar training adaptations for the anthropometric parameters, cardiorespiratory parameters and performance, it is worth noting that there was superior effect of RPE reduction and improve in mitochondrial efficiency for twice a day training.

Key words: Exercise training. Transmission electron microscopy. Mitochondria. Glycogen. Carbohydrate. Athletic performance. Exercise test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema representativo dos eventos de sinalização envolvidos na resposta adaptativa mitocondrial ao treinamento de curto prazo no músculo esquelético humano. Os aumentos repetidos do RNAm precedem o aumento das proteínas transcricionais e mitocondriais durante as sessões de treino. As biópsias musculares do vasto lateral foram obtidas 4 e 24 horas após a primeira, terceira, quinta e sétima sessão de treino. (Adaptado de Perry et al., 2010, reproduzido com permissão)..... 23
- Figura 2.** Base Molecular de Adaptação ao Exercício. Representação esquemática de alterações na expressão de mRNA (painel inferior) e proteína (painel central) ao longo do tempo como consequência do exercício agudo e treinamento. A repetição de estímulos individuais (exercício agudo) conjuntamente determina adaptação fenotípica muscular. (Adaptado de Egan 2016, reproduzido com permissão)..... 25
- Figura 3.** Esquema das principais via de sinalização envolvidos no controle da biogênese mitocondrial (Adaptado de Hawley et al., 2014, reproduzido com permissão)..... 28
- Figura 4.** Visão geral do estudo e desenho experimental..... 40
- Figura 5.** Treinamento e distribuição de carboidratos entre os grupos duas vezes ao dia e diariamente..... 44
- Figura 6.** Expressão proteica de PGC1- α pré e pós treino para os grupos duas vezes ao dia e diariamente. Bandas representativas de Western blot e quantificação dessas bandas..... 46
- Figura 7.** Expressão proteica relativa dos complexos I-V pré e pós treino para os grupos duas vezes ao dia e diariamente. Bandas representativas de Western blot e quantificação dessas bandas..... 51
- Figura 8.** Atividade da citrato sintase pré e pós treino para os grupos duas vezes ao dia e diariamente..... 52
- Figura 9.** Respiração mitocondrial do músculo esquelético (A), valores expressos em relação a atividade da citrato sintase (B). Estado 2: adição de malato/piruvato, estado 3 respiração estimulada pela adição de Mg/ADP, estado 4: estado basal da respiração na presença de atractilósideo. Razão de controle de respiratório (RCR) foi calculado pela relação estado 3/estado 4. Os valores representados pela média \pm

SEM. # Significativa interação entre o treinamento x grupo $p < 0,05$. * Significativamente diferente do pré-treino, $p < 0,05$ 53

Figura 10. Lipídeos intramiocelulares dos músculos esqueléticos e mitocôndrias. Imagens da região intermiofibrilar (IMF) (à esquerda) e subarcolêmica (SS) (à direita) da fibra muscular esquelética (A). Conteúdo mitocondrial relativo das regiões intermiofibrilares e subsarcolêmicas (B). Conteúdo lipídico relativo das regiões intermiofibrilares e subsarcolêmicas (C). L, gota de lipídio; M, mitocôndrias; Z, linha Z; S, sarcolema. Os valores representados pela média \pm SEM..... 54

Figura 11. Respostas cardiorrespiratórias e de percepção de esforço em repouso, 15 min, 25 min, 50 min, 75 min e 100 min em teste de carga constante de 100 min. VO_2 : consumo de oxigênio; VE Volume minuto; FC: frequência cardíaca; VCO_2 : produção de CO_2 ; PSE: percepção subjetiva do esforço; RER: Relação de troca respiratória. Existiu um efeito significativo de treinamento para FC, PSE, VO_2 , VE e VCO_2 em ambos os grupos. # Interação significativa entre grupo x treinamento x tempo, $p < 0,05$ 56

Figura 12. Custo de O_2 em teste de carga constante. * Significativamente diferente do pré-treino $p < 0,05$ 57

Figura 13. Produção de lactato em teste de carga constante de 100 min. * Significativamente diferente do pré-treino, $p < 0,05$ 57

Figura 14. Desempenho em teste contrarrelógio de 48-kJ. *Significativamente diferente de pré-treino, $p < 0,05$ 58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.*** *Parâmetros de aptidão aeróbia obtidos no teste incremental* 55
- Tabela 2.*** *Redução de peso corporal e percentual de gordura após treinamento.* 58
- Tabela 3.*** *Análise nutricional ao longo do período de treinamento* 59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	<i>Acetyl Coenzyme A Carboxylase</i>
AMPK	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	Análise de variância
BCGM	Baixo conteúdo de glicogênio muscular
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CHO	Carboidrato
COX	Citocromo c oxidase
CPT1	<i>Carnitine palmitoyltransferase I</i>
CS	Citrato sintase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
ERR α	<i>Estrogen-related receptor</i>
FABP3	<i>Fatty acid binding protein</i>
FADH2	Dinucleótido de flavina e adenina
FAT/CD36	<i>Fatty acid translocase</i>
FC	Frequência cardíaca
GLUT4	<i>Glucose transporter type 4</i>
GM	Glicogênio muscular
IMF	Intermiofibrilar
LIP	Lípido
LL1	Primeiro limiar de lactato
LL2	Segundo limiar de lactato
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NRF	<i>Nuclear respiratory factor</i>
P38MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
PAM	<i>Potência aeróbia máxima</i>
Pdk4	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase 4</i>
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PSE	Percepção subjetiva do esforço

PTN	Proteína
RCR	Razão de controle respiratório
RER	Razão de troca respiratória.
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SS	Subsarcolêmica
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Treino de endurance
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
Tfam	<i>Mitochondrial transcription factor A</i>
TI	Treino intervalado
VCO ₂	Produção de CO ₂
VE	Volume minuto
VO ₂	Consumo de oxigênio
β-HAD	<i>β-hidroxiacil-CoA desidrogenase</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 <i>Base molecular da adaptação ao exercício físico:</i>	22
2.2 <i>Adaptação ao treino de endurance:</i>	25
2.3 <i>Treino de endurance com baixo conteúdo de glicogênio muscular (BCGM):</i> ..	29
3 OBJETIVOS	34
3.1 <i>Objetivo geral</i>	34
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	34
4 HIPÓTESE	36
5 MÉTODOS	38
5.1 <i>Participantes</i>	38
5.2 <i>Desenho experimental</i>	38
5.3 <i>Teste incremental</i>	41
5.4 <i>Teste de carga constante de 100 min (100CC) e contrarrelógio de 48 kJ</i>	42
5.5 <i>Treinamento e controle dietético</i>	42
5.5.1 <i>Recuperação de glicogênio muscular</i>	43
5.5.2 <i>Sessão de treinamento de endurance (TE) para redução dos estoques de GM</i>	43
5.5.3 <i>Sessão de treinamento intervalado (TI)</i>	45
5.6 <i>Análises</i>	45
5.6.1 <i>Western Blot</i>	45
5.6.2 <i>Atividade da Citrato Sintase (CS)</i>	46
5.6.3 <i>Respiração mitocondrial</i>	47
5.6.4 <i>Microscopia eletrônica</i>	47
5.6.5 <i>Lactato plasmático</i>	48
5.7 <i>Análise Estatística</i>	48
6 RESULTADOS	50
7 DISCUSSÃO	61

8 CONCLUSÃO.....	67
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	78
ANEXO 1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE).....	82
ANEXO 2. Autorização para uso de figuras.....	88

1 INTRODUÇÃO

O treinamento de *endurance* promove múltiplas adaptações no músculo esquelético, como por exemplo, o aumento na atividade de enzimas oxidativas (citrato sintase (CS) e β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD)), biogênese mitocondrial e capacidade respiratória mitocondrial (Kiens *et al.*, 1993). O resultado final favorece uma elevação no metabolismo oxidativo e promove a melhora do desempenho em sessões de exercício posteriores (Kiens *et al.*, 1993; Egan e Zierath, 2013). A disponibilidade de nutrientes desempenha um papel central na modulação das adaptações do metabolismo oxidativo induzidas pelo treinamento (Coffey *et al.*, 2011). Nesta perspectiva, evidências sugerem que o início de uma sessão de treinamento com baixo conteúdo de glicogênio muscular (BCGM) pode aumentar a sinalização intracelular dos marcadores do metabolismo oxidativo em comparação ao treinamento tradicional, iniciado com reservas normais de glicogênio muscular (GM) (para revisão, ver (Jeukendrup, 2017)).

A esse respeito, demonstrou-se que 3 a 10 semanas de treinamento com BCGM resultam em maior elevação em CS e β -HAD (Hansen *et al.*, 2005; Yeo *et al.*, 2008; Hulston *et al.*, 2010) e oxidação de lipídeos (Yeo *et al.*, 2008; Hulston *et al.*, 2010), quando comparado ao treinamento convencional. Essas alterações moleculares foram acompanhadas por aumento no tempo até a exaustão em teste a 90% da potência máxima após o treino com BCGM (Hansen *et al.*, 2005). Contudo, é importante notar que para reduzir os estoques musculares de glicogênio, a maioria dos estudos realizou uma primeira sessão de exercício uma ou duas horas antes da sessão principal, método denominado treinamento duas vezes ao dia (Hansen *et al.*, 2005; Yeo *et al.*, 2008; Morton *et al.*, 2009; Hulston *et al.*, 2010; Cochran *et al.*, 2015). Uma primeira série de exercício realizada algumas horas antes da segunda série de exercício poderia potencializar o aumento na expressão de vários genes relacionados à biogênese mitocondrial nessa segunda sessão, que não necessariamente estaria ligado diretamente ao BCGM.

Por outro lado, recentemente foi introduzido outro conceito de treinamento com BCGM; também conhecido como “*sleep low*” (Lane *et al.*, 2015; Marquet *et al.*, 2016). Nesta abordagem o treinamento é realizado uma vez ao dia, onde há um primeiro exercício noturno para reduzir o conteúdo de GM, que é seguido por uma

segunda sessão de exercício na manhã do dia seguinte (~ 11h de intervalo). Ou seja, os treinos diários são intercalados entre um exercício para depleção de GM (seguidos ou não de refeição com baixo carboidrato) e um exercício realizado com BCGM (Lane *et al.*, 2015; Marquet *et al.*, 2016).

Este protocolo reduz a influência do exercício anterior na segunda série de exercício e institui o efeito isolado do GM nas adaptações induzidas pelo treinamento. Além disso, permanecer em jejum após depleção de GM pode prolongar o tempo de ativação de transcrição de genes metabólicos e tradução de suas proteínas alvo, uma vez que as reservas de GM permanecem reduzidas por várias horas (Pilegaard *et al.*, 2005). De fato, a estratégia de treino diariamente (*sleep low*) aumenta a expressão gênica dos marcadores de oxidação lipídica como Pdk4, além de fosforilação de AMPK, P38MAPK e ACC (Lane *et al.*, 2015). Tal como, três semanas de treinamento diário aumenta a eficiência durante o exercício submáximo e melhora o desempenho em contrarrelógio 10 km (Marquet *et al.*, 2016).

Em relação a estratégias de treinamento com BCGM, dados recentes do nosso grupo demonstram que a primeira série de exercício induz aumento na expressão de RNAm de genes relacionados à biogênese mitocondrial, como Pgc-1 α , Pgc-1 α 1, Pgc-1 α 4 e Ppar β/δ e p53 independente dos níveis de GM (Amorim-Souza *et al.*, dados não publicados).

As adaptações induzidas por treinamento com BCGM duas vezes ao dia e diariamente podem ocorrer por vias diferentes. Contudo, não se sabe qual estratégia de treinamento resulta em melhores adaptações no metabolismo oxidativo e na biogênese mitocondrial. Portanto, o presente estudo foi idealizado para avaliar se a magnitude das adaptações moleculares, funcionais e morfológicas ligadas à biogênese mitocondrial difere entre esses dois tipos de estratégias de treinamento com BCGM. A hipótese é que o treinamento duas vezes ao dia iria potencializar as adaptações de treinamento em comparação ao treinamento diariamente, uma vez que induz respostas agudas mais pronunciadas em genes relacionados à biogênese mitocondrial (Amorim-Souza *et al.*, dados não publicados).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Base molecular da adaptação ao exercício físico:

O exercício físico corresponde a uma ação exclusiva ou combinada de contrações concêntricas, excêntricas ou isométricas e representa uma perturbação metabólica no corpo. Na tentativa de enfrentar essa desordem, inúmeras respostas agudas e crônicas (adaptativas) ocorrem nos âmbitos molecular, celular e sistêmico, que agem em conjunto para minimizar essas perturbações generalizadas (Egan e Zierath, 2013; Hawley *et al.*, 2014).

Essas respostas adaptativas são determinadas por variáveis como modalidade, frequência, intensidade e duração das sessões de exercício, de modo que cada um desses fatores afeta as respostas moleculares e metabólicas. As modalidades de treino aeróbio (*endurance*) e resistido (ou de força) representam dois extremos do exercício (Egan e Zierath, 2013). Em termos genéricos o exercício de *endurance* impõe uma demanda de longa duração e baixa intensidade na contração muscular, enquanto que o de força impõe uma demanda de curta duração e alta intensidade. Embora os exercícios de *endurance* e de resistência promovam individualmente benefícios a saúde, diferentes modalidades de exercício promovem distintas respostas moleculares e metabólicas, e o resultado funcional corresponde a especificidade das respostas moleculares (Egan e Zierath, 2013).

As sucessivas contrações musculares resultantes do exercício acarretam quebra na homeostase celular, como aumento da razão AMP/ATP (elevação de AMP e/ou redução da ATP), redução da creatina fosfato e níveis de glicogênio, aumento no íon cálcio sarcoplasmático, elevação de ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio (ROS), acidose, alterações de NAD/NADH (Hawley *et al.*, 2006). Essas modificações provocadas por uma única série de exercício geram aumentos na transcrição de DNA nuclear e mitocondrial, resultando em aumento de RNA mensageiro (RNAm) e tradução proteica de genes específicos induzidos pelo exercício (Egan e Zierath, 2013). A esse fluxo de informações damos o nome de dogma central da biologia molecular (Crick, 1970).

A elevação transitória na expressão de RNAm costuma ter seu ápice entre 3-12 h após o término do exercício, retornando aos níveis basais num período de 24 h (Perry *et al.*, 2010b; Egan e Zierath, 2013) (Fig. 1). Contudo, apesar do aumento na

transcrição em RNAm ser essencial para induzir uma resposta celular adaptativa, o exercício físico pode regular outras mudanças moleculares como a expressão de genes mediante alterações no estado de metilação do DNA, modificações de histonas e expressão de micro-RNA (Hawley *et al.*, 2014).

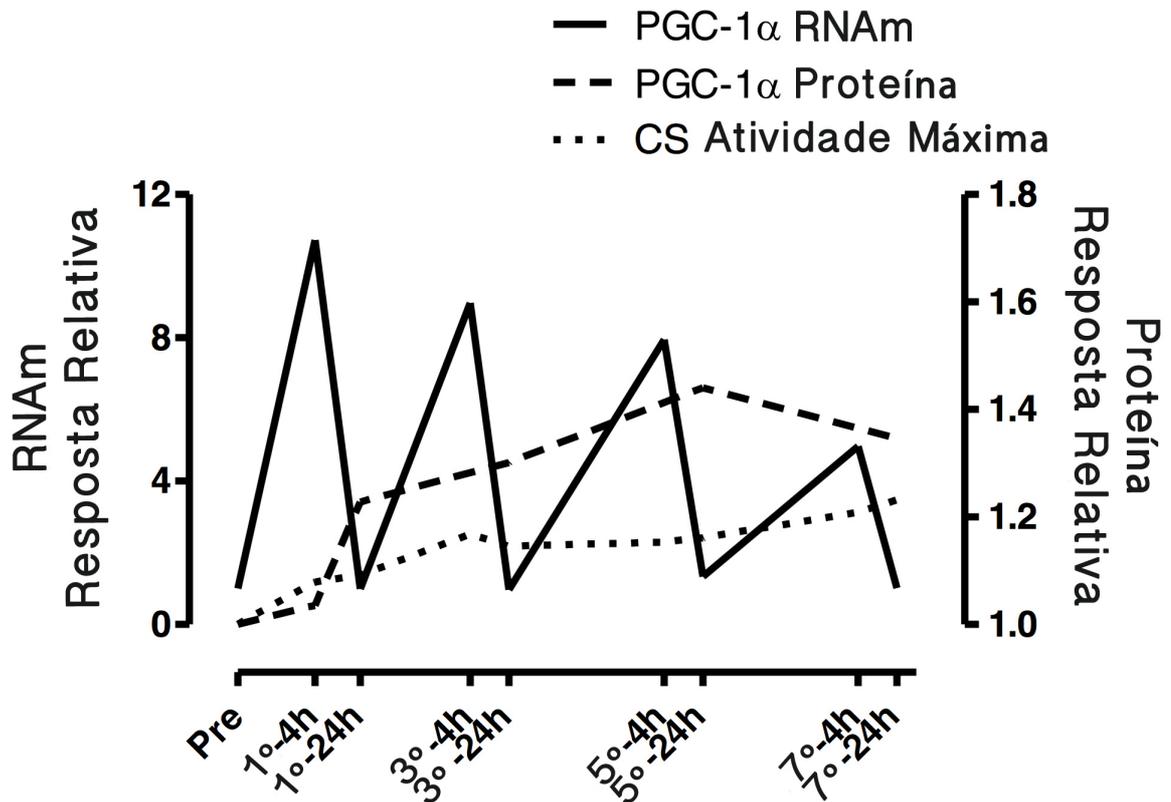


Figura 1. Esquema representativo dos eventos de sinalização envolvidos na resposta adaptativa mitocondrial ao treinamento de curto prazo no músculo esquelético humano. Os aumentos repetidos do RNAm precedem o aumento das proteínas transcricionais e mitocondriais durante as sessões de treino. As biópsias musculares do vasto lateral foram obtidas 4 e 24 horas após a primeira, terceira, quinta e sétima sessão de treino. (Adaptado de Perry *et al.*, 2010, reproduzido com permissão).

Em síntese, a superimposição de repetidos episódios de exercício irá resultar em aumento da atividade transcricional, com elevação na expressão de RNAm que subsequentemente amplifica a síntese de proteínas, resultando em remodelamento estrutural e ajustes funcionais a longo prazo (Perry *et al.*, 2010a). A adaptação crônica ao treinamento ocorre graças aos efeitos cumulativos de cada série de exercício, que eleva o limiar do estado estável de proteínas específicas relacionadas ao exercício (Booth, 1996).

Essas alterações transitórias pós-exercício determinam mudanças na transcrição de genes do metabolismo de carboidrato (CHO), transporte, mobilização e oxidação de lipídeos, metabolismo mitocondrial, fosforilação oxidativa e biogênese mitocondrial (Egan e Zierath, 2013). O propósito dessas alterações é melhorar o desempenho na realização de um exercício futuro, preservando a homeostase em face da perturbação metabólica, além de promover maior resistência à fadiga (Booth e Thomason, 1991).

Durante o exercício agudo, a contribuição da oxidação de CHO e lipídeos para a provisão de energia é determinada principalmente pela intensidade e duração do exercício, mas também por fatores externos como dieta prévia, sexo e condições ambientais. A potência absoluta estabelece a demanda por ATP e o gasto energético (Egan e Zierath, 2013; Hawley *et al.*, 2014). A contribuição energética fornecida pela oxidação de lipídeos reduz com o incremento na intensidade ao passo que há um aumento na oxidação de CHO, sendo o GM o principal combustível. De maneira oposta, durante o exercício prolongado e de intensidade baixa e moderada, há redução nas taxas de oxidação dos CHO à medida que a lipólise e a oxidação das gorduras aumentam (Spriet, 2014). A junção de elementos intramusculares como disponibilidade de substrato, mudança de temperatura, aumento de cálcio sarcoplasmático, aumento de produtos da degradação de ATP (ADP, AMP, IMP, Pi); e elementos sistêmicos como nível plasmático de hormônios chaves e metabólitos circulantes regulam a mobilização e utilização de substratos energéticos (Hawley *et al.*, 2006). Como visto anteriormente, esses fatores estão envolvidos não apenas na regulação da resposta aguda ao exercício como também na ativação de vias de sinalização para adaptação crônica ao treinamento (Fig. 2) (Hawley *et al.*, 2014).

No período de recuperação pós exercício ocorre o reestabelecimento da homeostase celular, para isso há ressíntese de ATP e fosfocreatina, oxidação e remoção de lactato, e respostas inflamatórias e anti-inflamatórias além da restituição das reservas de GM, (Borsheim e Bahr, 2003). Ao contrário do que ocorre durante o exercício, na recuperação há aumento na oxidação de lipídeos via triglicerídeos intramusculares e ácidos graxos livres e uma economia no consumo de CHO a fim de satisfazer as necessidades energéticas e ressíntese de GM (Kiens e Richter, 1998). Em contraste com a depleção rápida do GM durante o exercício prolongado

ou intenso, a reposição do GM para os níveis basais requer um período de 24 a 48 horas (Jentjens e Jeukendrup, 2003). Esta linha do tempo é facilmente alterada pela manipulação dietética, onde a suplementação de CHO após o exercício eleva a síntese de glicogênio em $20-50 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ ps}\cdot\text{h}^{-1}$, enquanto a não ingestão de CHO reduz a síntese para $7-12 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ ps}\cdot\text{h}^{-1}$ (Jentjens e Jeukendrup, 2003). Além disso, seguindo as condições adequadas a suplementação de CHO pode produzir um aumento da concentrações de GM pré-exercício conhecido como "supercompensação" (Bergstrom e Hultman, 1966).

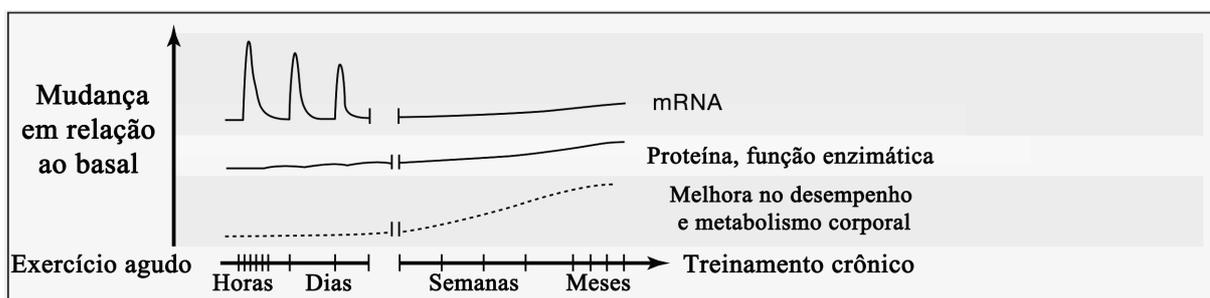


Figura 2. Base Molecular de Adaptação ao Exercício. Representação esquemática de alterações na expressão de mRNA (painel inferior) e proteína (painel central) ao longo do tempo como consequência do exercício agudo e treinamento. A repetição de estímulos individuais (exercício agudo) conjuntamente determina adaptação fenotípica muscular. (Adaptado de Egan 2016, reproduzido com permissão).

2.2 Adaptação ao treino de *endurance*:

O treinamento de *endurance* corresponde a programas de exercício sustentado por tempo, intensidade e frequência suficientes para induzir melhora na capacidade aeróbia. Esta capacidade aeróbica, por sua vez, pode ser definida como a habilidade em transportar e consumir oxigênio para suportar a atividade muscular durante o exercício (Armstrong e Barker, 2011). Outros efeitos do treino de *endurance* estão associados ao maior armazenamento de GM e sua economia durante exercício em intensidades submáximas (Armstrong e Barker, 2011).

O treinamento de *endurance* promove diversas adaptações no músculo esquelético (Kiens *et al.*, 1993). Dentre as mais importantes estão: 1) aumento na atividade de enzimas mitocondriais como complexo IV (COX) (Wibom *et al.*, 1992), 2) aumento na atividade de enzimas ligadas ao sistema oxidativo, como a CS, e a oxidação de ácidos graxos, como a β -HAD (Kiens *et al.*, 1993), 3) aumento na concentração de proteínas transportadores de substrato energético como GLUT4 e

FAT/CD36 (Little *et al.*, 2010); 4) ativação de moléculas que desempenham papel na biogênese mitocondrial, incluindo PGC-1 α , AMPK e p38MAPK (Philp *et al.*, 2011); 5) aumento de conteúdo mitocondrial e lipídico no músculo esquelético (Tarnopolsky *et al.*, 2007; Meinild Lundby *et al.*, 2018).

Desde o trabalho pioneiro de John Holloszy na década de 1960, sabe-se que o exercício é um estímulo potente para promover a biogênese mitocondrial (ou seja, a aquisição de novos componentes mitocondriais que levam ao aumento do conteúdo e função mitocondrial) (Holloszy, 1967). Esse estímulo resulta em sinalização, transcrição, tradução, importação de precursores de proteínas e a incorporação simultânea de produtos gênicos mitocondriais e nucleares. Com o objetivo de se adaptar as mudanças no ambiente celular e manter a função mitocondrial, essa organela está constantemente sofrendo processos de fusão (junção de duas organelas em uma) e fissão (a divisão de uma única organela em duas). As medidas de função mitocondrial (respiração mitocondrial) associadas à mensurações do conteúdo mitocondrial (avaliada pela expressão de CS e/ou microscopia eletrônica) são necessárias para elevar a acurácia e confirmar os resultados por meio da medida direta de conteúdo mitocondrial (Adhihetty *et al.*, 2003; Bishop *et al.*, 2014; Mishra e Chan, 2016).

O coativador PGC-1 α é considerado o regulador mestre da biogênese mitocondrial, entre outras funções também desempenha papel determinante na angiogênese e metabolismo de gorduras (Baldelli *et al.*, 2014). O exercício de *endurance* é um estímulo potente da transcrição de PGC-1 α além de regular sua atividade por meio de modificações pós-traducionais (fosforilação e deacetilação) (Egan e Zierath, 2013). Quando ativado, o PGC-1 α age por meio do recrutamento e regulação de múltiplos fatores de transcrição que modulam a expressão de genes do músculo esquelético, incluindo NRF-1 e 2 (*nuclear respiratory factor*), ERR α (*estrogen-related receptor*) e Tfam (*mitochondrial transcription factor A*) (Lin *et al.*, 2005). Adicionalmente, o PGC-1 α é o coativador da família de PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), onde os três subtipos (PPAR α , γ e δ) estão associados a regulação da homeostase lipídica por meio da expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos mitocondriais. Assim, a expressão de PPAR está ligada ao aumento da utilização de gordura durante o exercício

prolongado e também um maior número de fibras musculares de capacidade oxidativa (Luquet *et al.*, 2003).

A AMPK é um heterotrímero complexo que compreende uma subunidade catalítica ($\alpha 1$ ou $\alpha 2$) com um domínio quinase serina/treonina e duas subunidades regulatórias ($\beta 1$ ou $\beta 2$ e $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 3$). Nos mamíferos cada subunidade resulta em doze possíveis combinações do complexo AMPK (Hardie e Sakamoto, 2006). A AMPK é ativada pela fosforilação em Thr172 da subunidade α , um processo catalisado pela proteína LKB1 (*liver kinase b1*) ou CaMKK α (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase*) e CaMKK β , especialmente a última (Lage *et al.*, 2008). A AMPK é um indicador clássico do nível de energia intracelular que modula o equilíbrio de energia (homeostase) dentro da célula (Lage *et al.*, 2008). Deste modo, a AMPK ativa, isto é, em sua forma fosforilada, atua em muitos tecidos como um mecanismo contra-regulatório que desativa processos que consomem ATP, enquanto ativa processos catabólicos que produzem ATP, restaurando a relação AMP:ATP. Por exemplo, a ativação de AMPK promove a oxidação de ácidos graxos e a captação de glicose no músculo esquelético e no coração, ao mesmo passo que inibe a gliconeogênese no fígado, além da síntese de ácidos graxos e colesterol. A lipogênese também é reduzida no tecido adiposo pela ativação de AMPK (Lage *et al.*, 2008) (Fig. 3).

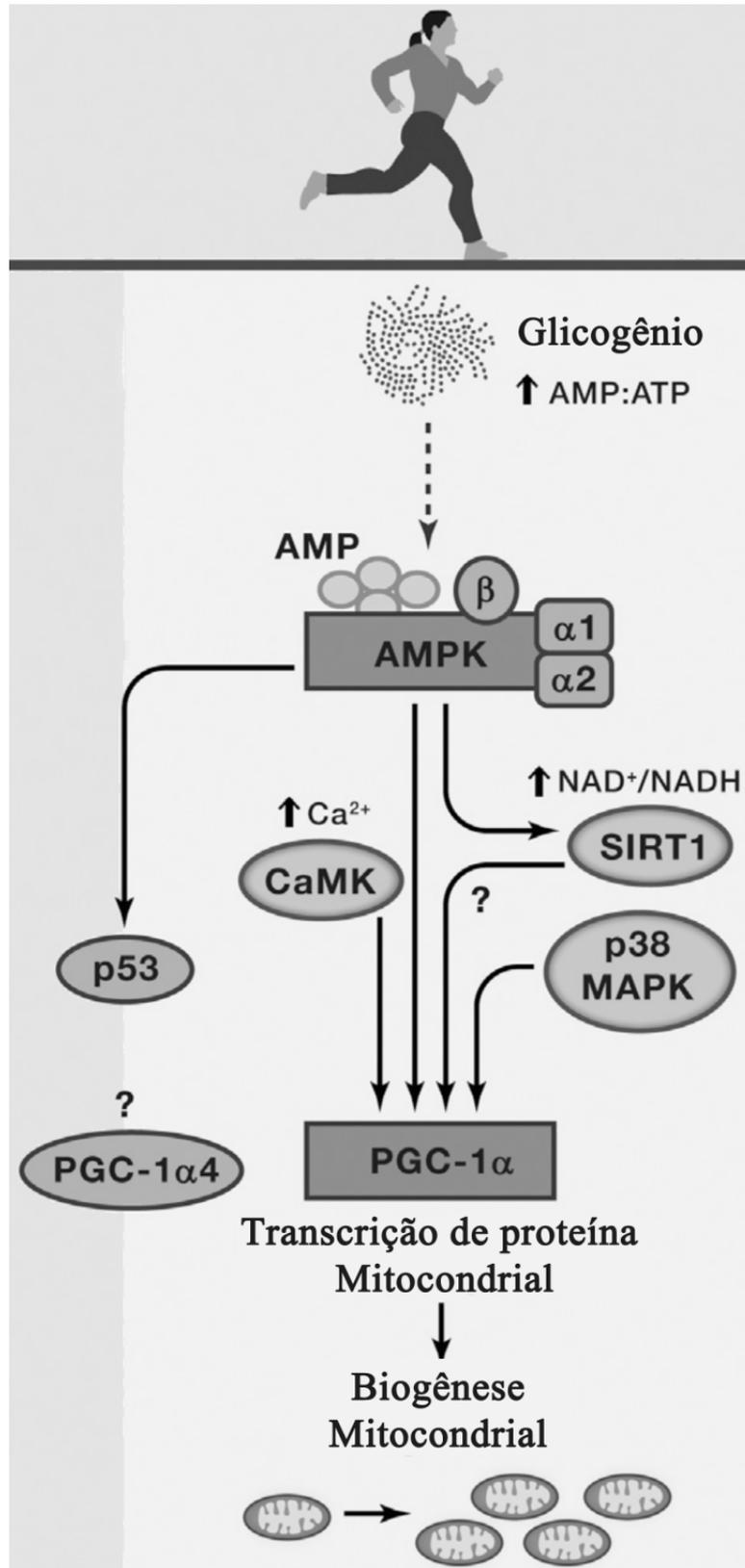


Figura 3. Esquema das principais via de sinalização envolvidos no controle da biogênese mitocondrial (Adaptado de Hawley *et al.*, 2014, reproduzido com permissão).

A ativação da p38MAPK é desencadeada tanto após exercícios de *endurance*, quanto de força. Sua função está relacionada a regulação da expressão de genes miogênicos e mitocondriais e a atividade da ubiquitina ligase (Egan e Zierath, 2013). Além disso, durante a contração muscular a p38MAPK estimula fatores de transcrição que regulam a ativação de PGC-1 α , desencadeando biogênese mitocondrial. A deleção dessa molécula evita aumentos na biogênese mitocondrial e angiogênese induzidos pelo treinamento (Pogozelski *et al.*, 2009). Assim, a p38MAPK está relacionada a biogênese mitocondrial, desempenhando papel significativo na adaptação após o treinamento de *endurance* (Egan e Zierath, 2013).

2.3 Treino de *endurance* com baixo conteúdo de glicogênio muscular (BCGM):

Com o intuito de melhorar o desempenho dos atletas, os cientistas do esporte estão continuamente procurando estratégias para potencializar as adaptações ao exercício. Nesse sentido, estudos recentes sugerem que o treinamento com BCGM proporciona maior adaptação muscular quando comparado ao treino equivalente em um estado de GM normal. Isto é, iniciar uma sessão de treinamento com os estoques de GM já reduzidos pode otimizar algumas das adaptações descritas anteriormente, resultando em melhora no desempenho futuro (Hansen *et al.*, 2005).

A manipulação de estoques de GM estimula diferentes vias que podem ser responsáveis por aumentar a resposta adaptativa ao treino, como por exemplo: 1) mudanças na atividade do sistema nervoso simpático; 2) mudanças na atividade de proteínas que contêm sítio de ligação com glicogênio e alterações na oxidação de CHO e gorduras (Philp *et al.*, 2011). O mecanismo pelo qual isso ocorre não está claro, mas sugere-se que exista uma interação gene-substrato, de maneira que a disponibilidade de um determinado substrato interfira na regulação da expressão gênica induzida pelo exercício. Por exemplo, muitos fatores de transcrição celular apresentam sítio de ligação com o GM, quando o GM está baixo, esses fatores são liberados para se ligar com diversas proteínas alvo para promover adaptações (Hansen *et al.*, 2005; Yeo *et al.*, 2008; Hulston *et al.*, 2010; Yeo *et al.*, 2010).

Como dito anteriormente, a AMPK possui função regulatória na biogênese/função mitocondrial e metabolismo de lipídeos. A subunidade β da AMPK possui sítio de ligação com a molécula de glicogênio. Com a ligação do glicogênio

nessa subunidade há inibição alostérica da atividade da AMPK (a inibição é feita por uma ligação em outro sítio que não corresponde ao catalítico), bloqueando moléculas reguladas pela AMPK (Mcbride *et al.*, 2009). De fato, a ingestão de CHO durante o exercício reduz ou impede a ativação da AMPK (Philp *et al.*, 2011), sugerindo que a disponibilidade de CHO ativa AMPK β . Ao contrário, exercícios de alta intensidade realizados com BCGM aumentam a atividade da AMPK α comparado ao exercício equivalente em estado pleno de glicogênio, sugerindo uma modulação direta do glicogênio para esta via (Yeo *et al.*, 2010; Philp *et al.*, 2011; Lane *et al.*, 2015).

Um dos primeiros a investigar o efeito de se treinar com BCGM sobre as adaptações intramusculares foi Pilegaard *et al.* (2002), que avaliou homens fisicamente ativos em cicloergômetro. Foi realizado um exercício para depleção de GM em apenas uma perna, seguido de uma sessão de treino bilateral no dia seguinte, de modo que uma perna treinou com BCGM e a outra com GM normal. Foi encontrada uma elevação na transcrição dos genes que codificam as enzimas mitocondriais PDK4 e UCP3 apenas na perna com GM reduzido, sugerindo uma sinalização para redução no metabolismo de CHO e maior utilização de lipídeos como substrato energético (Pilegaard *et al.*, 2002). Usando um modelo similar de exercício em homens destreinados, porém de forma crônica (10 semanas de treinamento), Hansen *et al.* (2005) observou que o treinamento de extensão de joelho com a perna com BCGM resultou em maior liberação de adrenalina e noradrenalina durante o exercício e aumento significativo na atividade das enzimas CS e β -HAD, o qual foi associado a um melhor desempenho, quando comparado ao treinamento com à perna contralateral com alto GM (Hansen *et al.*, 2005).

Adequando o modelo para situação real, isto é, de treino simultâneo com as duas pernas, dois estudos (Yeo *et al.*, 2008; Hulston *et al.*, 2010) dividiram atletas em dois grupos (alto e baixo GM) que treinaram durante 3 semanas (18 sessões no total). Em concordância com o estudo anterior, o treinamento com BCGM foi mais eficiente em aumentar a atividade das proteínas CS e β -HAD, além do incremento no conteúdo de COX IV em comparação com o grupo alto GM. Além disso, o grupo BCGM, reduziu a taxa de oxidação de CHO e aumentou a de oxidação de gorduras, mas não houve diferença no desempenho entre os grupos (Hulston *et al.*, 2010).

Na tentativa de elucidar o mecanismo adaptativo do exercício com BCGM, Yeo *et al.* (2010) ao avaliar atletas bem treinados encontraram aumento na AMPK no grupo de exercício com BCGM em relação ao alto glicogênio, logo, a manipulação de glicogênio é capaz de melhorar adaptações após exercício agudo mesmo em indivíduos bem treinados (Yeo *et al.*, 2008; Hulston *et al.*, 2010).

Associando o treino com BCGM e ingestão de CHO, Cochran *et al.* (2015), investigou o efeito de duas sessões diárias de exercício de alta intensidade em cicloergômetro separados por 3h de recuperação (duas semanas de treino). Os indivíduos foram separados em dois grupos, o grupo que treinava com BCGM ingeria placebo no período de recuperação da primeira sessão de treino, enquanto o outro grupo ingeriu CHO para reposição do GM no intervalo dos exercícios. Foi encontrada melhora no desempenho em contrarrelógio de 250 kJ apenas no grupo que treinou a segunda sessão sem reposição de CHO.

Além disso, a restrição de ingestão de CHO durante as primeiras horas de recuperação pós exercício, tem sido uma estratégia de periodização nutricional capaz de elevar os marcadores do metabolismo de substratos e melhorar a adaptação ao treinamento de *endurance* (Pilegaard *et al.*, 2005). Com esse objetivo, estudos recentes utilizaram a estratégia de dormir com baixo CHO após a primeira sessão treino. Lane *et al.* (2015) avaliou ciclistas treinados submetidos a dois experimentos: uma sessão de treino intervalado de alta intensidade durante a noite e uma sessão de carga constante no dia seguinte, entre as sessões de treino os indivíduos ingeriram refeição com CHO ou não se alimentaram. Foi encontrado aumento das proteínas ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*) e CPT1 (*Carnitine palmitoyltransferase I*), aumento na transcrição de PDK4, CD36 e FABP3 (*fatty acid binding protein*), além de maior fosforilação de AMPK, p38MAPK e ACC, na condição de baixo CHO em relação ao estado alimentado, essas alterações foram acompanhadas por uma maior oxidação de gordura (Lane *et al.*, 2015).

Um estudo interessante realizado por Marquet *et al.* (2016), combinou três estratégias de dieta e exercício em triatletas: 1) treino intervalado de alta intensidade com alta disponibilidade de CHO; 2) restrição de CHO durante a noite para prolongar a sinalização pós exercício e 3) uma sessão de treino prolongado com baixa disponibilidade de CHO; para o grupo controle não houve restrição de CHO durante

a noite e todas as sessões de exercício foram realizadas com conteúdo CHO normal ou alto. Houve redução no peso corporal e massa gorda, redução na oxidação de CHO e aumento na eficiência em teste submáximo, além de melhora no desempenho em teste contrarrelógio de 10 km, apenas no grupo que treinou com baixo CHO (Marquet *et al.*, 2016).

Outra estratégia utilizada para potencializar as adaptações induzidas pelo exercício de *endurance* em homens recreacionalmente ativos, foi associar exercício com BCGM à suplementação de proteína antes, durante e após o exercício em cicloergômetro. Não houve diferença entre as condições de suplementação e placebo, e de maneira interessante, a ingestão de proteína não impediu o aumento na fosforilação de AMPK e transcrição de PGC-1 α (Taylor *et al.*, 2013).

No entanto, não se sabe qual estratégia de treinamento com baixo glicogênio muscular possui melhor resposta adaptativa ao treino de *endurance*: treinar duas vezes por dia (onde há influência do exercício prévio associado ao treinamento com baixo glicogênio) ou treinar diariamente (onde há um efeito mais prolongado da influência do baixo glicogênio muscular). É provável que no treinamento duas vezes ao dia a primeira sessão de treino induza aumento de genes relacionados a adaptação ao treino havendo uma adaptação molecular, funcional e morfológica superior em comparação ao treino diariamente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar se dois tipos de estratégias de treinamento com BCGM resultam em diferentes adaptações moleculares, funcionais e morfológicas ligadas à biogênese mitocondrial.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o grau de adaptação acerca de:

a) Proteínas relacionadas a biogênese (PGC1- α) e respiração mitocondrial (Complexos I-V), além da atividade enzimática de proteína chave do metabolismo oxidativo (Citrato sintase);

b) Conteúdo mitocondrial e lipídico nas regiões subsarcolêmicas e intermiofibrilares;

c) Parâmetros cardiorrespiratórios (frequência cardíaca, volume minuto, consumo de oxigênio, produção de CO₂, razão de troca respiratória) e PSE durante exercício de carga constante;

d) Desempenho físico (potência média durante um teste contrarrelógio) e antropometria (massa corporal, percentual de gordura, massa magra, massa gorda)

E comparar entre as estratégias de treinamento duas vezes ao dia e diariamente.

_____ **HIPÓTESE**

4 HIPÓTESE

A primeira sessão de treino induz aumento de genes relacionados a adaptação ao treino e isso pode afetar a expressão gênica da segunda sessão de treino devido ao curto período de recuperação (2 h). Dessa forma, a hipótese do presente estudo é que haverá uma adaptação molecular, funcional e morfológica de maior magnitude após o treinamento duas vezes ao dia, em comparação ao treinamento diariamente.

5 MÉTODOS

5.1 Participantes

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Esforço situado na Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória (UFPE-CAV). Foram convidados a participar desse estudo 15 homens saudáveis, fisicamente ativos ($26,2 \pm 5,3$ anos, $1,8 \pm 0,1$ m e $75,8 \pm 10,6$ kg). Todos os participantes, após serem informados sobre os possíveis riscos e benefícios do estudo e dos procedimentos aos quais seriam submetidos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), parecer: 728.899-19/06/2014 (Anexo 1).

5.2 Desenho experimental

O desenho experimental foi dividido em três partes: 1) pré-treino; 2) treino e; 3) pós-treino (Fig. 4).

1) Pré-treino: Durante a primeira visita foi realizada antropometria para determinação da massa corporal, estatura e percentual de gordura, este último utilizando as dobras cutâneas do peitoral, abdômen e coxa (Jackson e Pollock, 1978). Em seguida, uma amostra do músculo vasto lateral foi obtida por um médico por meio de biópsia, com anestesia local na pele e fáscia (lidocaína 2%), utilizando a técnica com agulha de biópsia (D.L.MICOF, São Paulo, Brasil) percutânea com sucção (Bergstrom, 1962). A amostra muscular foi rapidamente separada em três porções, sendo: 1) uma porção (~50 mg) imediatamente congelada (entre 10-15 s) em nitrogênio líquido para posterior análise de expressão proteica por western blot; 2) uma segunda porção (~15 mg) imediatamente imersa em solução gelada de preservação (BIOPS) para análise de respiração mitocondrial; 3) uma terceira porção (~4 mg) imediatamente imersa em fixador para posterior análise de conteúdo mitocondrial e lipídico por meio de microscopia eletrônica. Em seguida, os participantes foram mantidos em repouso por 10 min e realizaram um teste incremental até a exaustão em um cicloergômetro (Ergo Fit 167, Pirmansens, Germany) para determinação do $VO_2\max$, potência aeróbia máxima (PAM), primeiro (LL1) e segundo (LL2) limiar de lactato (Bishop *et al.*, 1998). Trinta minutos após o teste incremental, os indivíduos foram submetidos a três familiarizações do teste

contrarrelógio de 48 kJ em cicloergômetro, com intervalos de 20 minutos. Após 48 h, os participantes retornaram ao laboratório e realizaram um exercício de carga constante (CC) na intensidade correspondente a 50% da diferença entre o LL1 e o LL2 ($\Delta 50$: LL1-LL2) com duração de 100 min (100CC). Após o término do 100CC, foram dados cinco minutos de repouso e foi realizado um teste contrarrelógio de 48 kJ.

2) Treino: Após concluir os testes da fase pré-treino, os participantes foram divididos em dois grupos experimentais. Um grupo treinou diariamente ($n=7$), uma vez ao dia, e o outro grupo três vezes por semana, duas vezes ao dia ($n=8$). Os participantes foram distribuídos entre os grupos de acordo com seu nível de aptidão física, isto é, cada voluntário foi alocado de acordo com seu $VO_2\text{max}$ e PAM para não existir diferença no condicionamento pré-treino entre os grupos, foi realizado teste t que comprovou que os grupos eram semelhantes para aptidão aeróbia ($p<0,05$). Em ambos os grupos, o protocolo de treinamento consistiu em uma sessão de treino de *endurance* (TE), para redução dos estoques de GM, seguido por uma sessão de treino intervalado de alta intensidade (TI), totalizando 18 sessões de treinamento em um período de 3 semanas. Os participantes foram orientados a não realizar nenhum tipo de atividade física, exceto a prescrita acima, durante as três semanas de treinamento, bem como, a seguir um plano dietético rigoroso.

3) Pós-treino: As mesmas medidas feitas no pré-treino, foram repetidas no pós-treino. A biópsia foi realizada no mesmo período do dia (± 1 h), na mesma perna em que foi feita a medida pré-treino (separadas por 2-3 cm da primeira incisão), obtida 48 h após a última sessão de treinamento para evitar o efeito transitório do exercício na atividade transcricional, que pode durar até 24h (Egan e Zierath, 2013). Em seguida foi realizado o teste incremental pós-treinamento. Por fim, após um intervalo de 48 horas, foi realizado o exercício de *endurance* em carga constante na mesma carga absoluta pré-treino, seguido do teste contrarrelógio de 48 kJ.

Todos os testes experimentais e sessões de treino foram realizados em condição controlada de temperatura e umidade relativa ($21,34 \pm 1,34^\circ\text{C}$ e $40,5 \pm 5,1\%$, respectivamente).

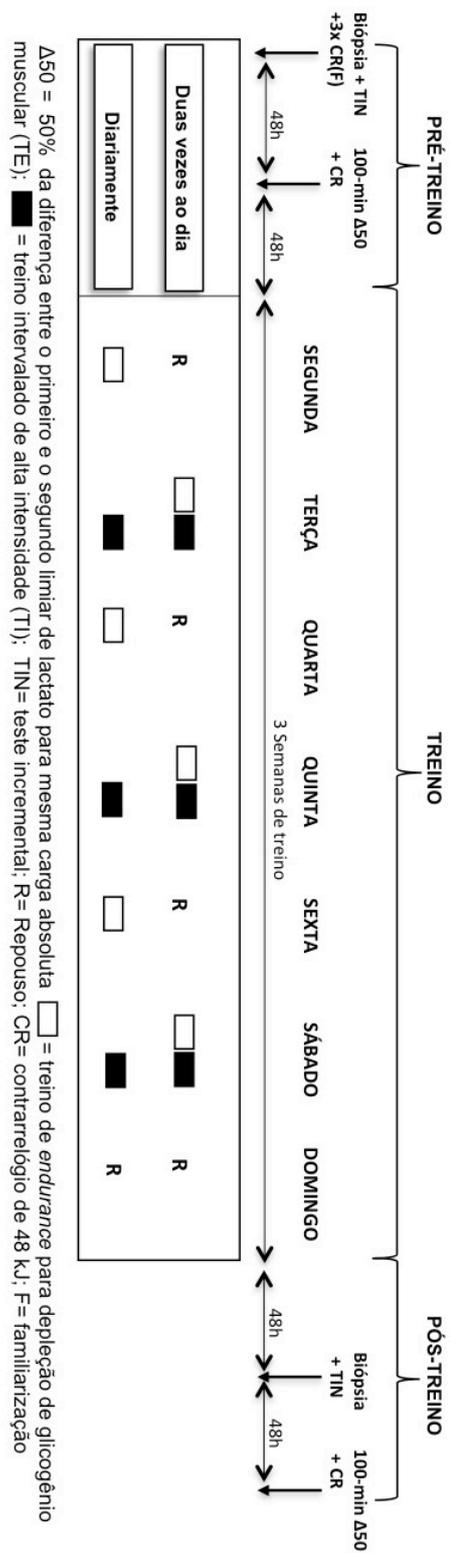


Figura 4. Visão geral do estudo e desenho experimental

5.3 Teste incremental

O teste incremental foi composto de estágios com 4 minutos de duração e 1 minuto de recuperação entre os estágios. O teste iniciou a 50 W e a intensidade foi incrementada em 25 W a cada 4 minutos até a exaustão voluntária. Durante todo o teste os indivíduos mantiveram a rotação do pedal entre 70 e 80 rpm. O teste foi interrompido quando os indivíduos não conseguiram manter a rotação dentro desse intervalo. O consumo de oxigênio (VO_2), a produção de gás carbônico (VCO_2) e a ventilação (VE) foram mensurados em cada ciclo ventilatório durante todos os testes. Para isso, os indivíduos utilizaram uma máscara para captação das respostas da ventilação e trocas gasosas mensuradas por um sistema computadorizado e com transmissão imediata, respiração a respiração, para um software específico (Cortex Metalyzer 3B, Cortex Biophysik, Leipzig, Germany). Antes de cada teste o analisador foi calibrado com uma concentração conhecida de gases O_2 e CO_2 . A frequência cardíaca (FC) foi mensurada através de um transmissor acoplado ao analisador de gases. Antes do exercício e imediatamente após cada estágio foram coletados 50 μ l de sangue arterializado no lóbulo da orelha para determinação da concentração de lactato sanguíneo no plasma.

Os valores de VO_2 respiração a respiração foram convertidos posteriormente para médias a cada 10s e o VO_{2max} foi determinado quando dois ou mais dos seguintes critérios foram atendidos: aumento de VO_2 menor que $2,1 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ em dois estágios consecutivos, razão de troca respiratória maior que 1,1, concentração de lactato no plasma maior que $8,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e frequência cardíaca máxima ± 10 bpm da prevista pela idade (Howley *et al.*, 1995). A FC máxima (FC_{max}) foi definida como o maior valor obtido ao final do teste. A PAM foi calculada a partir do último estágio de trabalho concluído, somada a fração de tempo gasto no último estágio não concluído multiplicado por 25 W (Kuipers *et al.*, 1985). As concentrações de lactato plasmático foram plotadas em função da potência (W) para identificação do LL1 e LL2. Para determinar o LL1, um critério visual foi utilizado, considerando a potência na qual a concentração de lactato no plasma aumentou acima dos níveis de repouso. O LL1 foi determinado por dois avaliadores experientes, em caso de discordância um terceiro avaliador foi consultado. O LL2 foi determinado pelo método Dmax modificado, descrito pelo ponto na curva de regressão polinomial da

relação lactato-potência que produziu a distância máxima perpendicular da linha reta formada entre o LL1 e o ponto final da curva (Bishop *et al.*, 1998).

5.4 Teste de carga constante de 100 min (100CC) e contrarrelógio de 48 kJ

Após chegarem ao laboratório, os participantes repousaram por 5 min e depois realizaram um exercício de carga constante na intensidade correspondente a 50% da diferença entre o LL1 e o LL2 ($\Delta 50$: LL1-LL2) com duração de 100 min. Os participantes foram orientados a manter a rotação do pedal entre 70 e 80 rpm durante todo o tempo de exercício. O VO_2 , VCO_2 e VE foram mensurados durante o exercício. Amostras de sangue venoso foram coletadas pré e pós-teste de carga constante para mensuração de lactato. Após intervalo de 5 min que sucedeu o teste de 100CC, os participantes realizaram o teste contrarrelógio de 48 kJ. Os participantes foram solicitados a concluir o teste no menor tempo possível, e orientados que quanto maior a carga, mais rápido o teste seria concluído. O trabalho realizado foi mantido visível no painel do cicloergômetro. O teste foi interrompido quando os indivíduos atingiram 48 kJ.

5.5 Treinamento e controle dietético

Os participantes preencheram um registro alimentar informando o tempo, a preparação de alimentos e a quantidade de cada refeição consumida durante as 24 h antes do primeiro e segundo dia dos testes pré-treinamento. Os participantes foram instruídos a repetir o mesmo consumo de alimentos durante as 24 h antes do primeiro e segundo dia dos testes pós-treinamento, respectivamente. Os participantes foram instruídos a abster-se do consumo de álcool e cafeína 24 h antes de cada teste.

Os participantes receberam uma lista de todas as refeições a serem seguidas durante o período de treinamento, e foram convidados a enviar fotografias de refeições-chave para um nutricionista. Para o grupo diariamente, as refeições antes da sessão de TE (café da manhã, almoço e lanche) foram estabelecidas respeitando a dieta normal individual (45-65% de CHO, 10-35% de proteína e 20-35% de lipídeos). Os participantes consumiram uma refeição com baixo CHO (7% de CHO, 60% de lipídeos e 33% de proteína) duas horas antes de cada sessão de TE (~ 5:00 p.m.). A sessão de TE ocorreu às segundas, quartas e sextas-feiras (a partir das 7:00 p.m. às 9:00 p.m.). Após o treinamento, os participantes consumiram uma

quantidade de água equivalente a 150% da massa corporal perdida para prevenir a desidratação (Shirreffs *et al.*, 1996) e depois jejuaram até a manhã seguinte (terças, quintas e sábados). Os participantes ingeriram o café da manhã ~ 5:00 a.m. com baixo teor de CHO (7% de CHO, 60% de lipídeos e 33% de proteínas) para evitar a ressíntese muscular e hepática do glicogênio. Os participantes iniciaram a sessão TI (~ 11: 00 a.m.) após um jejum adicional de ~ 6 h (Figura 5).

O grupo duas vezes ao dia seguiu o mesmo padrão alimentar do grupo diariamente, conservando a mesma composição e horário de refeições no dia anterior ao treinamento. Durante o dia de treinamento, o café da manhã foi ingerido (~ 5:00 a.m.) com baixo teor de CHO (7% de CHO, 60% de lipídeos e 33% de proteína); Os participantes jejuaram por cerca de ~ 2 h e então realizaram uma sessão de TE (~ 7:00 a.m.). Eles consumiram uma quantidade de água equivalente a 150% da massa corporal perdida, descansaram por mais 2 h e depois realizaram a sessão TI (~ 11: 00 a.m.). As sessões de treinamento de TE e TI foram realizadas às terças, quintas-feiras e sábados (Figura 5).

5.5.1 Recuperação de glicogênio muscular

Para acelerar a recuperação do GM imediatamente após completar o TI (~ 12:00 p.m.), os participantes dos dois grupos ingeriram uma bebida contendo CHO (1,2 g.kg⁻¹ massa corporal) + proteína (0,4 g.kg⁻¹ de massa corporal) (Berardi *et al.*, 2006). Eles também consumiram refeições com conteúdo elevado de CHO às 12:30 p.m., 3:00 p.m. e 6:00 p.m. (75% de CHO, 10% de lipídeos e 15% de proteínas) (Berardi *et al.*, 2006).

5.5.2 Sessão de treinamento de *endurance* (TE) para redução dos estoques de GM

Os participantes pedalarão por 100 min a uma intensidade correspondente a $\Delta 50$: LL1 - LL2. Logo após, repousaram por 5 min e realizaram 6 séries à 125% da PAM, com 1 min de recuperação passiva entre elas. Este protocolo foi responsável por reduzir os estoques de GM em ~45% (Amorim-Souza *et al.*, dados não publicados). Os participantes foram orientados a manter a rotação do pedal entre 70 e 80 rpm durante todo o treino (Costill *et al.*, 1973; Gollnick *et al.*, 1973; Gollnick *et al.*, 1974).

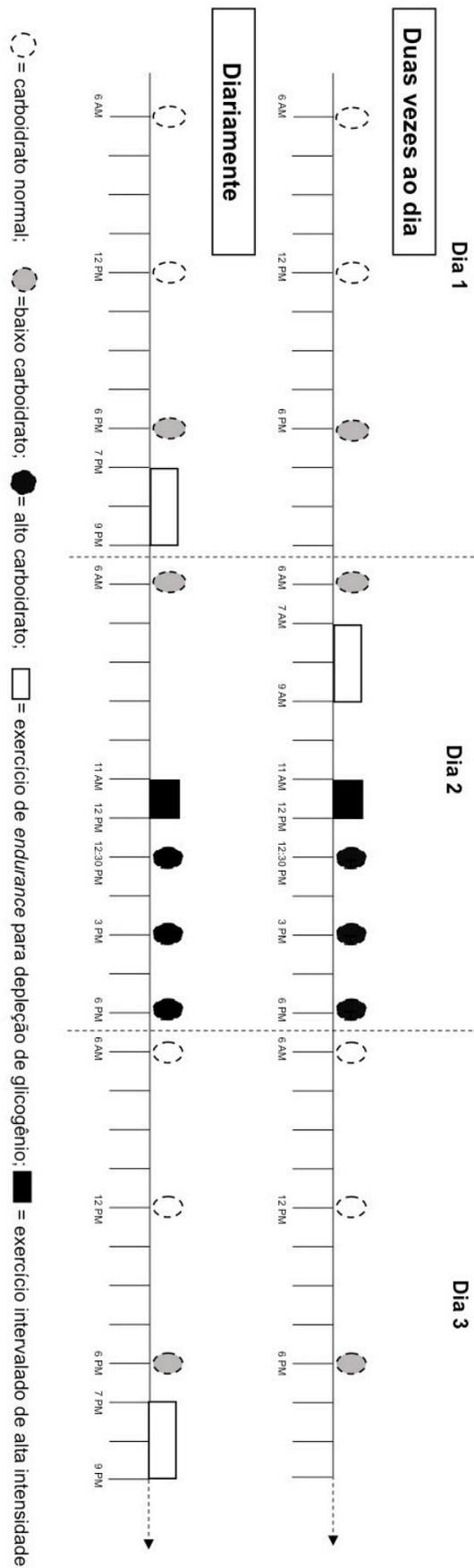


Figura 5. Treinamento e distribuição de carboidratos entre os grupos duas vezes ao dia e diariamente.

5.5.3 Sessão de treinamento intervalado (TI)

Após 5 min de aquecimento a 90% do LL1, os participantes realizaram a sessão de TI. O treino consistiu de 10 séries com duração de 2 min a uma intensidade correspondente à 20% da diferença entre a LL2 e PAM e o ($\Delta 20$: LL2-PAM), com 1 min de recuperação entre as séries (razão trabalho-recuperação de 2:1). Os participantes foram orientados a manter a rotação do pedal entre 70 e 80 rpm durante os 2 min de estímulo e a recuperação foi passiva (Edge *et al.*, 2006).

5.6 Análises

5.6.1 Western Blot

Foi realizado o Western blot do lisado celular com o intuito de verificar a conteúdo proteico de PGC-1 α , Complexo I, Complexo II, Complexo III, Complexo IV e Complexo V.

Homogeneizado muscular e dosagem de proteína

Aproximadamente 20 mg de tecido muscular congelado foram homogeneizados usando um TissueLyser II (Qiagen, Valencia, CA) em uma diluição 1:20 de tampão RIPA gelado (pH 7,4) contendo: 0,15 mol·L⁻¹ NaCl, 1% Triton-X100, desoxicolato de sódio a 0,5%, Tris 0,05 mol·L⁻¹, 0,1% de SDS, 0,1 mol·L⁻¹ EDTA, 1% de coquetel de inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) e inibidor de fosfatase (P5726, Sigma-Aldrich). Os homogeneizados foram incubados em rotação continua durante 60 min a 4°C e o sobrenadante (isto é, citosólico bruto) foi então recolhido e o precipitado foi descartado. A concentração de proteína do homogeneizado muscular foi medida em triplicada utilizando um ensaio de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) comparado com concentrações de albumina de soro bovino (BSA, A9647, Sigma-Aldrich). O coeficiente de variação para a concentração proteica foi inferior a 5%.

O homogenado tamponado com RIPA foi diluído em tampão 4X Laemmli (Tris 0,25 mol·L⁻¹, SDS a 8%, glicerol a 40%, azul de bromofenol a 0,04%, 2-mercaptoetanol a 20%) e quantidades iguais de proteína total (10-20 μ g) foram pipetados no gel pré-moldado (Criterion™ 4-20% TGX Stain-Free™, Bio-Rad). Todas as amostras do mesmo participante foram pipetas em colunas adjacentes no

mesmo gel. Foram também pipetadas quatro a seis diluições diferentes de um padrão interno de homogeneizado misto em cada gel e uma curva de calibração plotada de densidade contra a concentração de proteína. A partir da equação de regressão linear a quantidade da proteína foi calculada a partir da intensidade da banda medida para cada amostra no gel (Murphy e Lamb, 2013).

A eletroforese em gel foi realizada durante 90 min a 80-150 V. As proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF de 0,2 μm a 25 V durante 10 min. As membranas foram bloqueadas durante 60 minutos à temperatura ambiente em 5% de leite sem gordura diluído em solução salina tamponada em Tris com Tween-20 a 0,1% (TBST). As membranas foram então lavadas em TBST e incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo primário apropriado diluído em 5% de BSA e 0,02% de azida de sódio em TBST. Após as lavagens com TBST, as membranas foram incubadas no anticorpo secundário correspondente, diluídas em 5% de leite sem gordura em TBST, durante 60 min à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, as membranas foram incubadas em solução quimioluminescente (1,25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 294 luminol, 0,2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ p -cumarico, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris pH 8,5, 0,009% H_2O_2) durante 2 min e imagens foram tomadas com um sistema de imagem ChemiDoc instalado (Bio-Rad). A densitometria foi realizada com o software Image Lab 5.0 (Bio-Rad). As imagens geralmente foram exibidas com pelo menos cinco bandas acima e abaixo da banda de interesse (NCB 2004). Os anticorpos utilizados foram PGC-1 α , rabbit monoclonal (Cell Signaling, 2178) e OXPHOS Complex I-V, mouse monoclonal (Abcam, ab110411).

5.6.2 Atividade da Citrato Sintase (CS)

A atividade da enzima CS foi determinada por espectrofotômetro medindo a aparência da CoA-SH na reação: [acetil-CoA + oxaloacetato + H_2O \leftrightarrow citrato + CoA-SH + H + (reação secundária: CoA-SH + 5,5'-Ditiobis- (2- ácido nitrobenzóico) (DTNB) \rightarrow íon mercaptídeo)]. Os homogeneizados para a atividade CS foram preparados em tampão (40 μl de acetil CoA 3 mM e 25 μl de ácido 5,59-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 1 mM em tampão Tris a 165 μl de tampão Tris 100 mM, pH 8,3) mantida a 30°C. A atividade da CS foi determinada em triplicada numa placa de microtitulação adicionando 5 μl do homogeneizado de músculo de 8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após a

adição de 15 mL de ácido oxoalacético 10 mM, a placa foi imediatamente colocada em um xMark- O espectrofotômetro de microplacas (Bio-Rad) a 30 °C e após 30 s de agitação linear, a absorbância a 412 nm foi registrada a cada 15 s durante 3 minutos. A atividade CS foi expressa em moles por hora por quilograma de proteína.

5.6.3 Respiração mitocondrial

Parte da amostra de músculo foi utilizada para estudos *in-situ* da respiração mitocondrial. As fibras musculares foram mecanicamente separada por meio de uma pinça de pontas, em uma solução de preservação BIOPS contendo (em mM) 2,77 CaK₂EGTA, 7,23 K₂EGTA, 5,77 Na₂ATP, 6,56 MgCl₂·6H₂O, 20 taurina, 50 MES, 15 Na₂phosphocreatina, 20 de imidazol e 0,5 ditioneitol (DTT) ajustado em pH 7,1 (Pesta e Gnaiger, 2012). A membrana plasmática foi posteriormente permeabilizada por agitação suave durante 30 min em BIOPS a 4° C contendo 50 mg/ml de saponina, seguido por 3 lavagens em MiR05, um meio de respiração que contém (em mM, a menos que especificado) 0,5 EGTA, 3 de MgCl₂·6H₂O, 60 K-lactobionato, 20 taurina, 10 KH₂PO₄, 20 HEPES, 110 de sacarose e 1 g/L de albumina de soro bovino essencialmente isento de ácido graxo. O pH 7,1 foi ajustado para essa solução (Pesta e Gnaiger, 2012). A respiração mitocondrial foi medida em duplicata (de 4-4,4 mg de peso úmido de fibras musculares) em MiR05 a 37°C, usando eletrodo de oxigênio tipo Clarc (Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, UK), por métodos previamente descritos (Bishop *et al.*, 2010).

5.6.4 Microscopia eletrônica

Para análise em microscopia eletrônica os fragmentos dos músculos foram fixados overnight em solução contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2. Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes no mesmo tampão, pós-fixadas numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄), 5mM CaCl₂ e 0,8% de ferricianeto de potássio (K₄Fe(CN)₆ em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, desidratado em acetona e incorporado em Embed 812 (Electron Microscopy Science, Washington, PA, EUA). A polimerização foi realizada a 60 °C durante 3 dias (Vieira *et al.*, 2011). Secções ultrafinas foram coletadas em redes de níquel de 300-mesh, contendo 5% de acetato de uranilo e citrato de chumbo e examinado com um microscópio eletrônico de

transmissão FEI Morgani 268D (América do Norte NanoPort, Hillsboro, OR, EUA). Um observador independente que era cego com relação ao estado de treinamento e grupo fotografou as fibras orientadas longitudinalmente, foi utilizada uma ampliação de x20,000, 12 imagens da região subsarcolemmal (SS) e 12 imagens da região intermiofibrilar (IMF) foram analisadas de ordem sistemática e randomizada num total de 720 imagens. As gotículas lipídicas e mitocondriais foram utilizadas usando o software Image J para calcular a mitocôndria total e área de lipídeos. As áreas mitocôndrias e lipídica da região intermiofibrilar (IMF) e subarcolemmal (SS) foram expressas em relação à área miofibrilar e à área superficial de fibra (Nielsen *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2017). A referência para a quantificação do espaço SS foi o espaço citoplasmático entre o sarcolemma e a primeira camada de miofibrilas.

5.6.5 Lactato plasmático

As amostras de 50 µL de sangue arterializado foram coletadas no lóbulo da orelha e diretamente armazenado em microtubos contendo 10 µL de EDTA. As amostras foram centrifugadas a 1500 g durante 10 minutos a 4°C (Hermle Labortechnik GmbH, Germany) e a concentração plasmática de lactato analisada em duplicata em Espectrofotômetro UV (Spectrophotometer SP-22), utilizando kit comercial (Labtest, Vista Alegre, Brasil).

5.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism versão 7.0a. Todos os dados foram verificados quanto à normalidade fazendo uso do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para investigar as diferenças entre os grupos e os efeitos de treinamento de 3 semanas, utilizou-se uma ANOVA de duas vias de medidas repetidas. As mudanças no exercício de 100 min foram avaliadas usando ANOVA de três vias de medidas repetidas. A análise post hoc foi realizada utilizando o método de Bonferroni para localizar diferenças entre os pares quando a significância estatística foi observada. A significância foi definida em $p < 0,05$. Os valores são expressos como média \pm DP, salvo indicação do contrário.

6 RESULTADOS

PGC1- α e Cadeia transportadora de elétrons (CTE)

Três semanas de treinamento com BCGM não modificaram a expressão de PGC-1 α ($p=0,20$) (Fig. 6). Também não houve diferença entre os grupos de treinamento duas vezes ao dia e diariamente ($p=0,72$). Este resultado se repetiu para as proteínas da cadeia transportadora de elétrons onde não houve efeito do treinamento: complexo I ($p=0,09$), complexo II ($p=0,06$), complexo III ($p=0,21$), complexo IV ($p=0,09$), complexo V ($p=0,16$) (Fig. 7). Tampouco houve diferença entre os grupos: complexo I ($p=0,66$), complexo II ($p=0,81$), complexo III ($p=0,72$), complexo IV ($p=0,95$), complexo V ($p=0,41$).

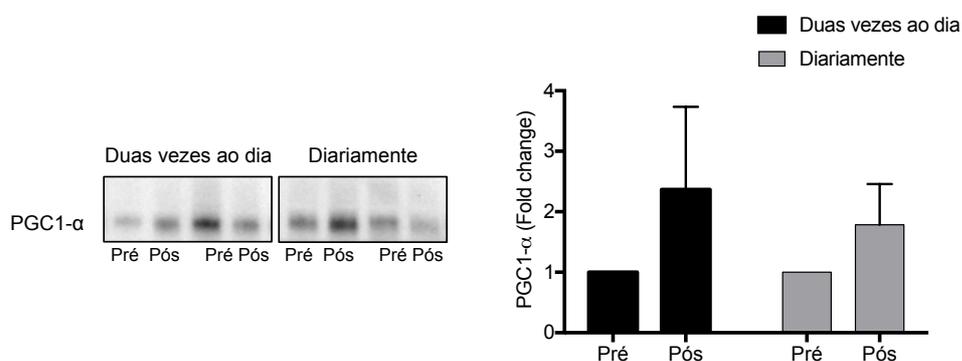


Figura 6. Expressão proteica de PGC-1 α pré e pós treinamento para os grupos duas vezes ao dia e diariamente. Bandas representativas de Western blot e quantificação dessas bandas. Dados representados em média \pm SEM.

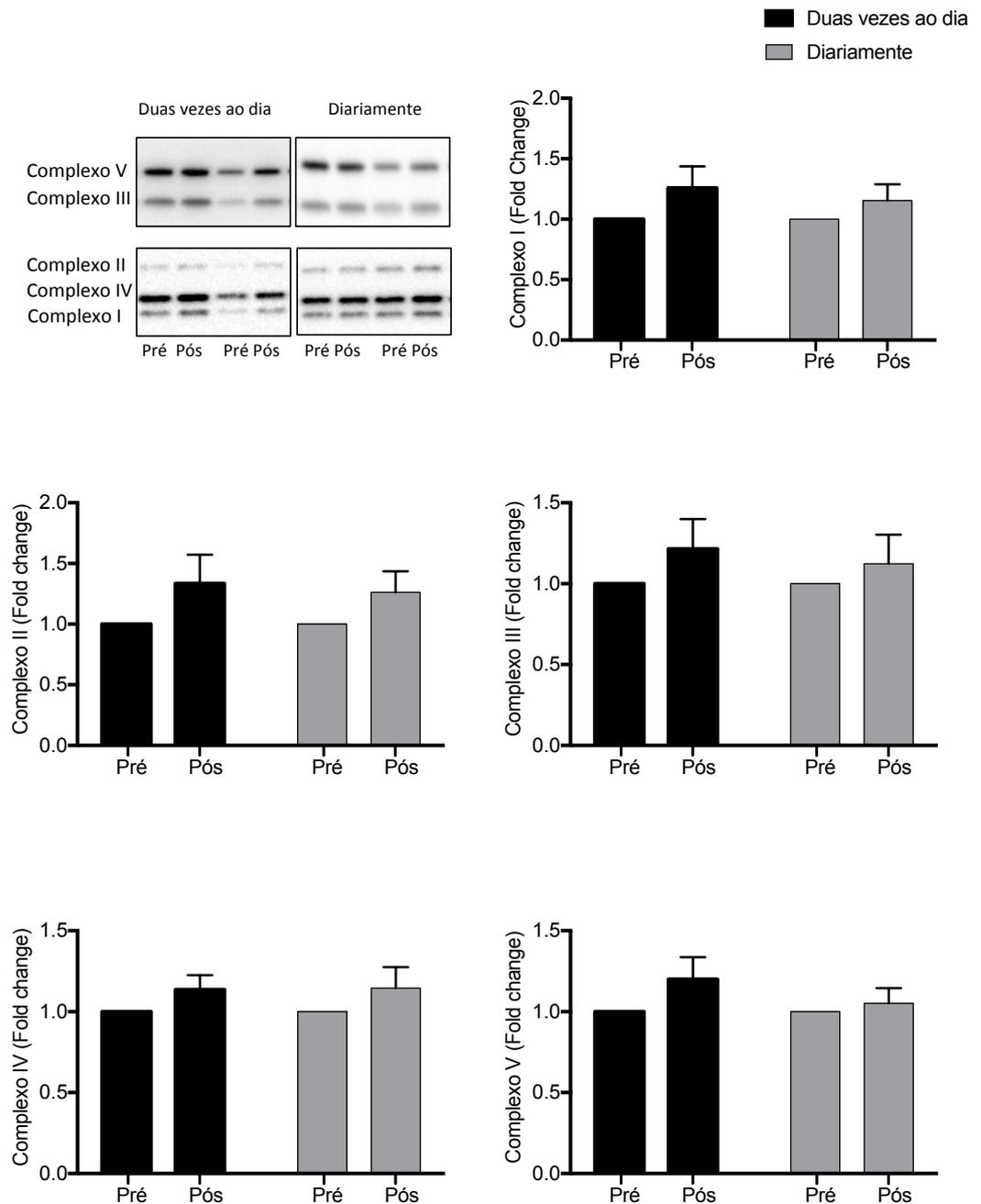


Figura 7. Expressão proteica relativa dos complexos I-V pré e pós-treinamento para os grupos duas vezes ao dia e diariamente. Bandas representativas de Western blot e quantificação dessas bandas. Dados representados em média \pm SEM.

Atividade da Citrato sintase

Como pode ser visto na Fig. 8, a atividade da CS para o grupo duas vezes ao dia não se alterou com treino ($p=0,61$) e nem foi diferente entre os grupos ($p=0,46$).

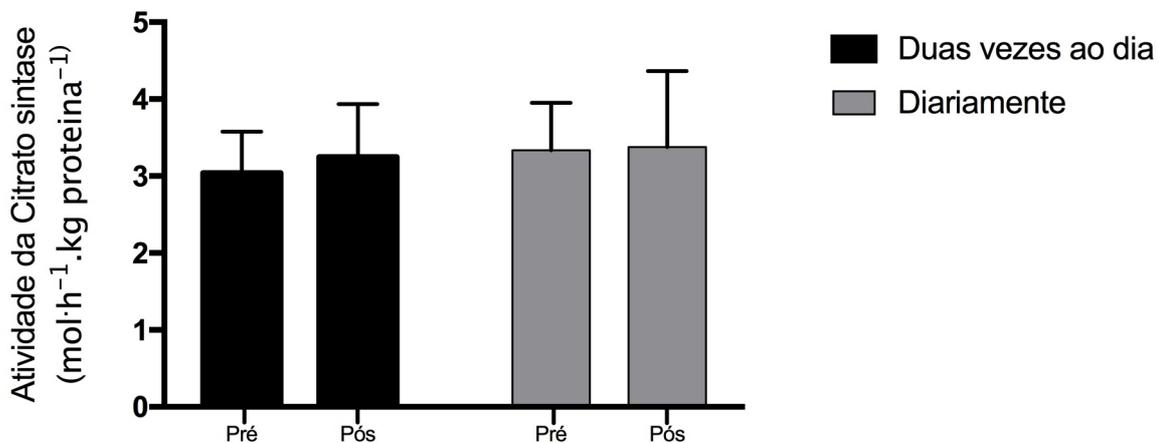


Figura 8. Atividade da citrato sintase pré e pós treino para os grupos duas vezes ao dia e diariamente. Dados representados em média \pm SEM.

Respiração mitocondrial

O treinamento não teve efeito para o estado 2 da respiração (Malato/Piruvato) para ambos os grupos (duas vezes ao dia pré: $7,8 \pm 8,7$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹ e pós: $8,7 \pm 4,7$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹, diariamente pré: $7,4 \pm 1,6$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹ e pós: $5,1 \pm 2,7$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹) (Fig. 9). Também não houve efeito do treinamento para o estado 3 (Magnesium/ADP), apesar de um aumento de 14% no grupo duas vezes ao dia (pré: $22,8 \pm 4,3$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹ e pós: $25,7 \pm 7,9$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹), mas sem mudanças estatística para o treino diariamente (pré: $22,6 \pm 5,1$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹ e pós: $21,0 \pm 3,2$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹). No entanto, para o grupo duas vezes ao dia o treinamento diminui a respiração do estado 4 (pré: $4,5 \pm 0,8$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹ e pós: $2,6 \pm 0,9$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹), sem alteração no grupo diariamente (pré: $3,4 \pm 1,3$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹ e pós: $3,9 \pm 1,0$ nmolO₂.mL⁻¹.min⁻¹) (interação grupo x treino $p < 0,001$). Esse efeito se manteve após a normalização com atividade da CS (Fig. 9.B). Um padrão semelhante foi observado para a razão de controle respiratório (RCR) (estado 3/estado 4), em que o treinamento duas vezes ao dia aumentou o RCR (pré: $5,1 \pm 1,1$ e pós: $10,8 \pm 3,7$), mas não houve efeito para o treino diariamente (pré: $7,7 \pm 2,4$ e pós: $5,8 \pm 1,7$) (interação grupo x treino, $p < 0,001$).

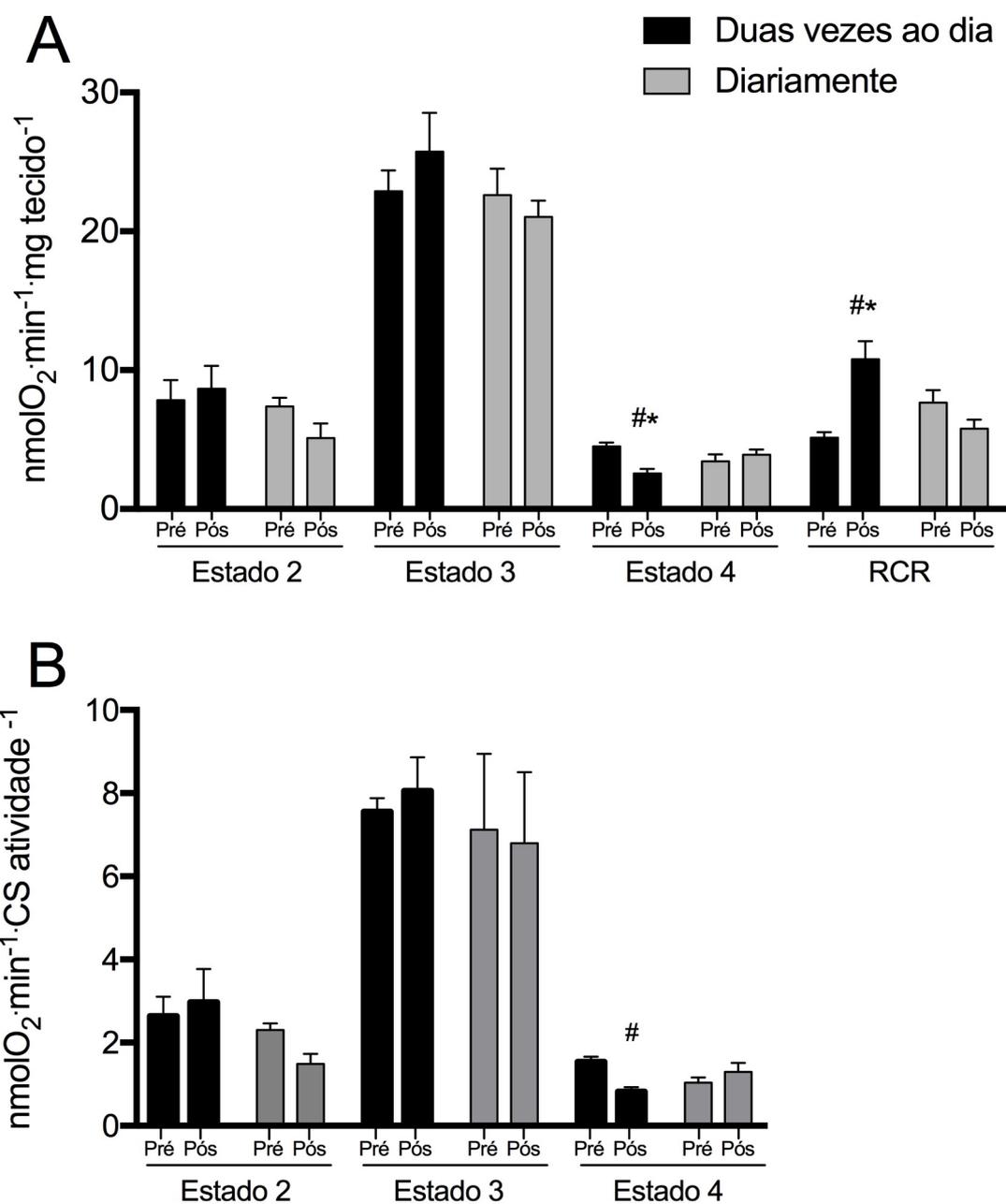
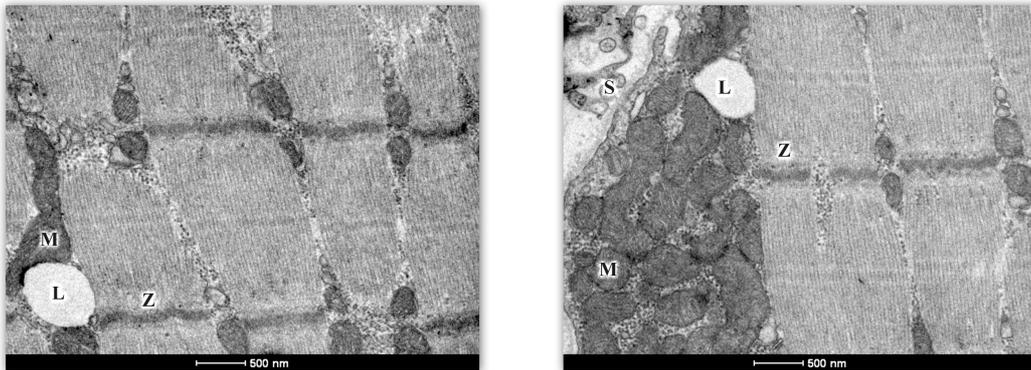


Figura 9. Respiração mitocondrial do músculo esquelético (A), valores expressos em relação a atividade da citrato sintase (B). Estado 2: adição de malato/piruvato, estado 3 respiração estimulada pela adição de Mg/ADP, estado 4: estado basal da respiração na presença de atractilósido. Razão de controle de respiratório (RCR) foi calculado pela relação estado 3/estado 4. Os valores representados pela média \pm SEM. # Significativa interação entre o treinamento x grupo $p < 0,05$. * Significativamente diferente do pré-treino, $p < 0,05$.

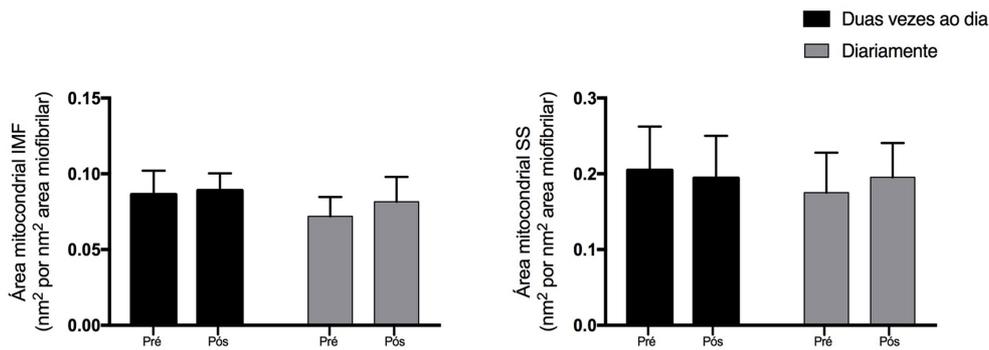
Microscopia eletrônica de transmissão

Um exemplo de imagem MET ilustrando as diferenças na regiões intermiofibrilar e subarcolêmica pode ser visto na Fig. 10A. Três semanas de treinamento físico não alteraram a média da área total de mitocôndrias e gotículas lipídicas para ambos os grupos nas regiões intermiofibrilar e subarcolêmica (Fig. 10B e C).

A



B



C

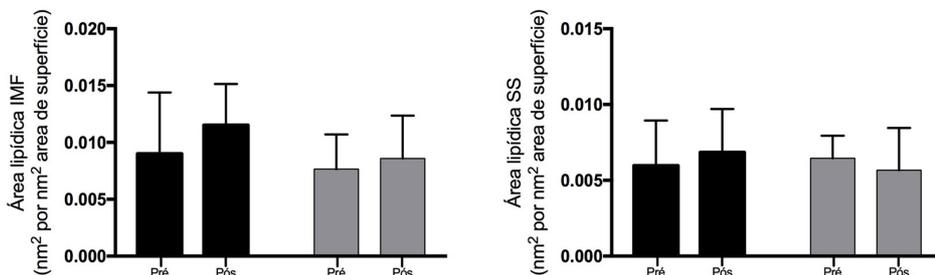


Figura 10. Lipídeos intramiocelulares dos músculos esqueléticos e mitocôndrias. Imagens da região intermiofibrilar (IMF) (à esquerda) e subsarcolemmal (SS) (à direita) da fibra muscular esquelética (A). Conteúdo mitocondrial relativo das regiões intermiofibrilares e subsarcolemmal (B). Conteúdo lipídico relativo das regiões intermiofibrilares e subsarcolemmal (C). L, gota de lipídeo; M, mitocôndrias; Z, linha Z; S, sarcolema. Os valores representados pela média \pm SEM.

Teste incremental

Os parâmetros basais obtidos no teste incremental foram semelhantes entre os grupos no pré-treinamento ($p > 0,05$). O treinamento elevou significativamente a PAM, $VO_2\text{max}$, concentração máxima de lactato sanguíneo e potência para o LL1 e LL2 ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 1. Parâmetros de aptidão aeróbia obtidos no teste incremental

	Duas vezes ao dia		Diariamente	
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino
PAM (W)	237 ± 36	270 ± 42*	235 ± 22	265 ± 24*
$VO_2\text{max}$ ($\text{mL}\cdot\text{w}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	36,1 ± 4,3	39,2 ± 5,5*	37,9 ± 7,8	40,2 ± 6,5*
$VO_2\text{max}$ ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	2,8 ± 0,4	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,6	2,9 ± 0,6
[Lac]pico	9,5 ± 2,4	11,3 ± 3,0*	10,5 ± 1,3	11,0 ± 1,5*
LL1 ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,4*	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,3*
LL1 (W)	88 ± 13	138 ± 33*	96 ± 17	132 ± 12*
LL2 ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	2,1 ± 0,4	2,5 ± 0,5*	2,0 ± 0,5	2,4 ± 0,5*
LL2 (W)	167 ± 34	201 ± 41*	164 ± 19	201 ± 18*

Valores representados em média ± desvio padrão. PAM: Potência aeróbia máxima; $VO_2\text{max}$: Consumo máximo de oxigênio; LL1: Primeiro limiar de lactato; LL2: Segundo limiar de lactato; [Lac]: concentração plasmática de lactato. *Significativamente diferente de pré-treino $p < 0,05$.

Teste de *endurance* de carga constante de 100 minutos

Houve um efeito de treinamento ($p < 0,05$) para FC, PSE, VO_2 , VE e VCO_2 , com todos os parâmetros sendo reduzidos com o treinamento em ambos os grupos, exceto para RER, que se manteve inalterada e similar entre os grupos ($p > 0,05$). Houve, entretanto, uma interação entre treinamento x grupo x tempo para PSE de maneira que a redução na PSE foi mais acentuada para o grupo que treinou duas vezes ao dia (Fig. 11). O custo de O_2 e o acúmulo de lactato foram reduzidos após o treinamento em ambos os grupos (Fig. 12 e 13, respectivamente).

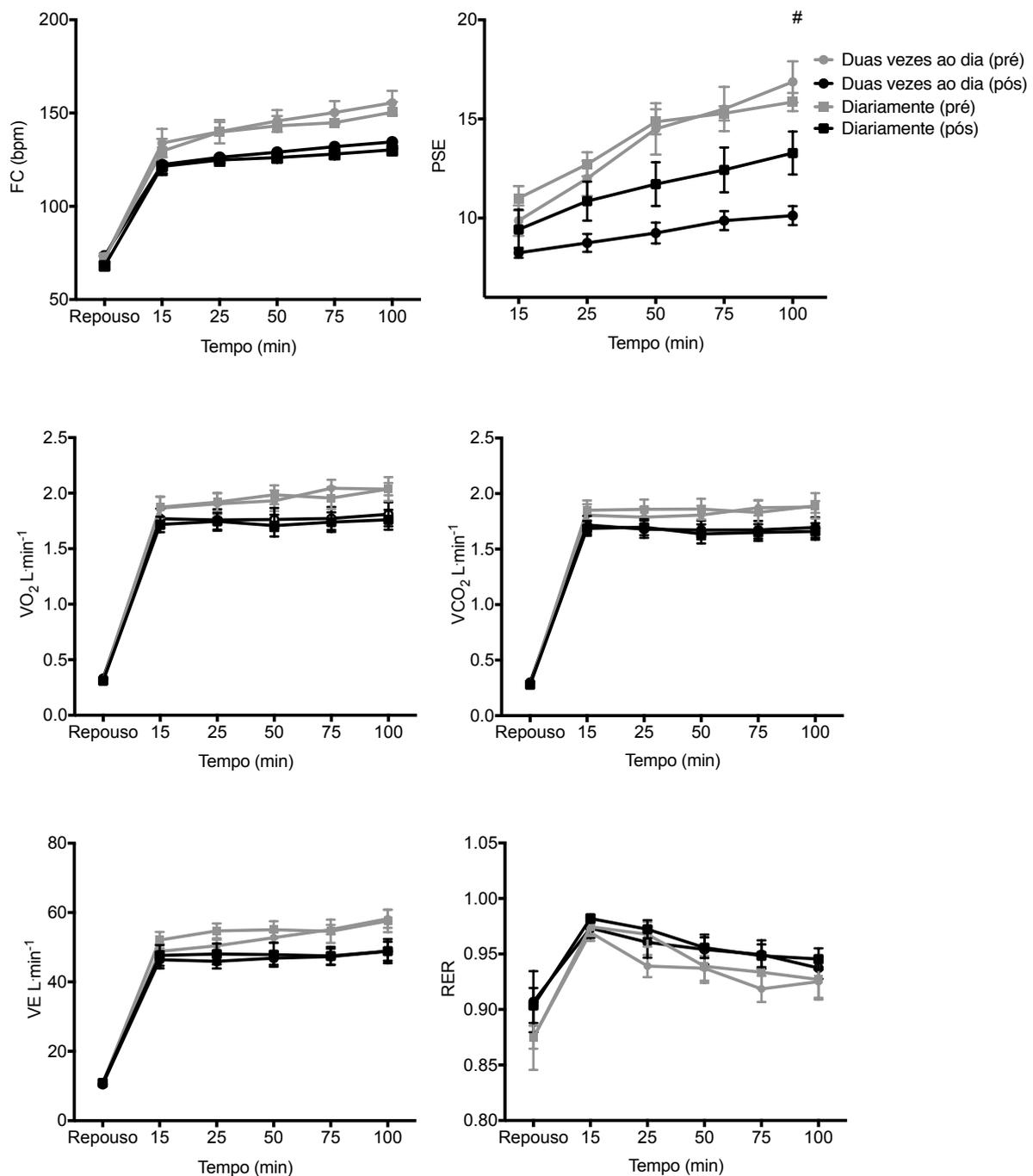


Figura 11. Respostas cardiorrespiratórias e de percepção de esforço em repouso, 15 min, 25 min, 50 min, 75 min e 100 min em teste de carga constante de 100 min. VO₂: consumo de oxigênio; VE Volume minuto; FC: frequência cardíaca; VCO₂: produção de CO₂; PSE: percepção subjetiva do esforço; RER: Relação de troca respiratória. Existiu um efeito significativo de treinamento para FC, PSE, VO₂, VE e VCO₂ em ambos os grupos. # Interação significativa entre grupo x treinamento x tempo, p<0,05.

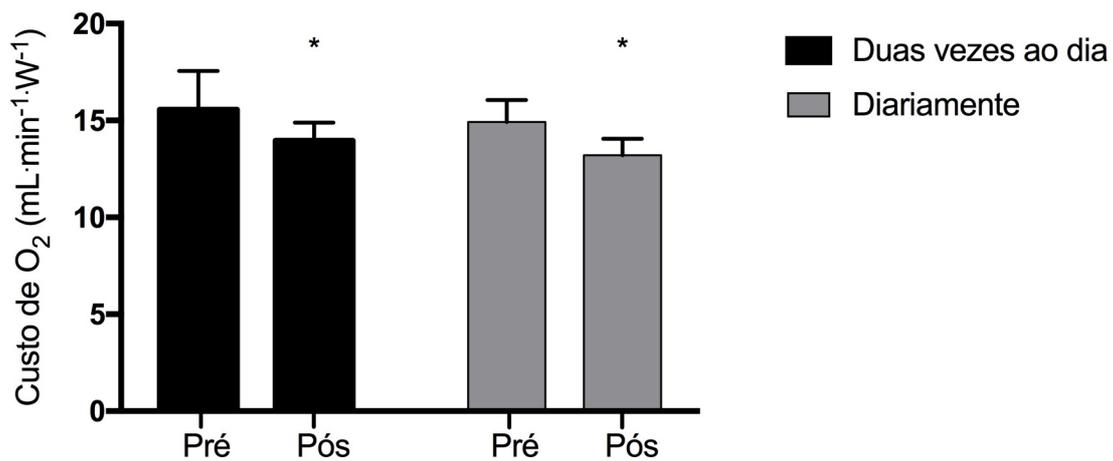


Figura 12. Custo de O₂ em teste de carga constante. * Significativamente diferente do pré-treino p<0,05.

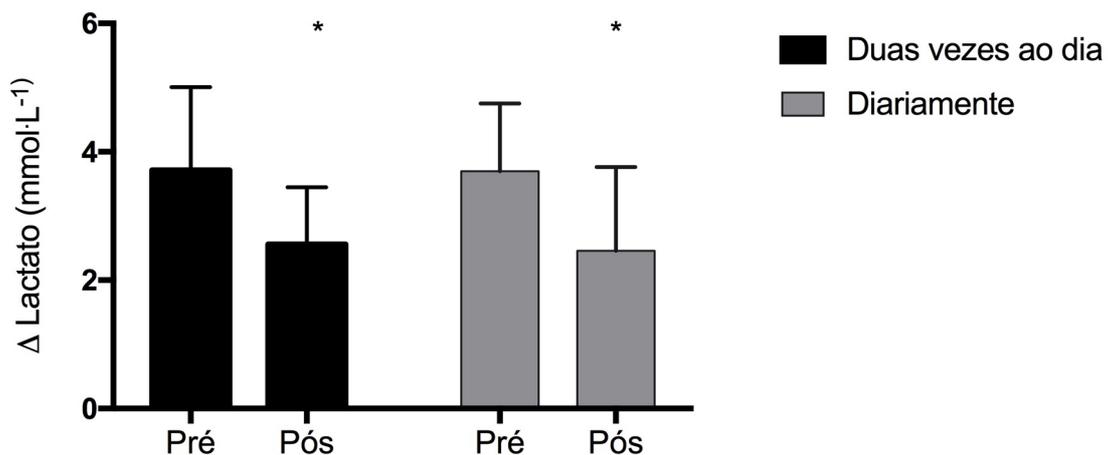


Figura 13. Produção de lactato em teste de carga constante de 100 min. * Significativamente diferente do pré-treino, p<0,05.

Teste contrarrelógio

O treinamento com baixo glicogênio resultou em aumento significativo da potência média para o teste contrarrelógio de 48 kJ em ambos os grupos (p<0,05) (Fig. 14). A potência média aumentou de 191,5 ± 78,1 W para 273,6 ± 64,9 W no grupo duas vezes ao dia e foi de 210,6 ± 29,8 W para 281,2 ± 21,9 W no treino diariamente.

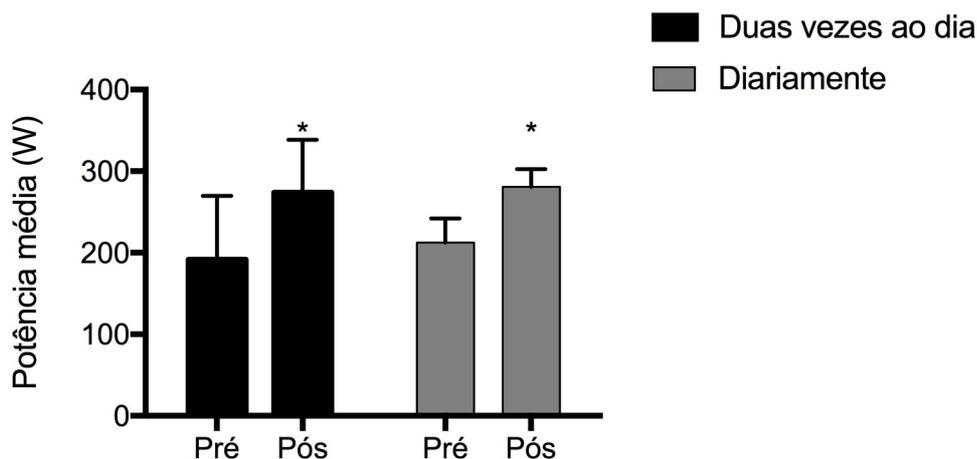


Figura 14. Desempenho em teste contrarrelógio de 48-kJ. *Significativamente diferente de pré-treino, $p < 0,05$.

Composição corporal

Os parâmetros da composição corporal foram semelhantes entre os grupos pré-treinamento ($p > 0,05$). Houve uma redução significativa no percentual de gordura, na massa corporal e massa gorda em ambos os grupos após o treinamento (Tabela 2, $p < 0,05$). Não houve alteração significativa na massa magra após o período de treinamento em nenhum dos grupos.

Tabela 2. Redução de peso corporal e percentual de gordura após treinamento.

	Duas vezes ao dia		Diariamente	
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino
Peso (kg)	78,8 ± 12,8	77,8 ± 12,9*	72,5 ± 7,0	71,7 ± 8,0*
G %	14 ± 4	12 ± 3*	13 ± 5	12 ± 3*
Massa gorda (kg)	11,1 ± 5,1	9,4 ± 3,2*	9,6 ± 3,6	9,0 ± 4,5*
Massa magra (kg)	67,6 ± 8,6	68,4 ± 10,1	62,9 ± 7,2	62,7 ± 6,8

Valores representados em média ± desvio padrão. G %: Percentual de gordura.

*Significativamente diferente do pré-treino, $p < 0,05$.

Intervenção dietética

Os participantes aderiram aos protocolos dietéticos prescritos e alcançaram uma ingestão total de energia ($p > 0,05$) e distribuição de macronutrientes similar entre os grupos durante o período de treinamento (Tabela 3).

Tabela 3. Análise nutricional ao longo do período de treinamento

Duas vezes ao dia				
	Energia (Kcal)	CHO (%)	PTN (%)	LIP (%)
Refeições de CHO normal	1998,6 ± 289,3	54 ± 3	20 ± 3	26 ± 3
Refeições de baixo CHO	1666,9 ± 255,6	7 ± 0	33 ± 0	60 ± 0
Refeições de alto CHO	3068,1 ± 340,9	75 ± 0	17 ± 0	8 ± 0
Diariamente				
	Energia (Kcal)	CHO (%)	PTN (%)	LIP (%)
Refeições de CHO normal	1697,7 ± 503,9	60 ± 6	16 ± 4	24 ± 7
Refeições de baixo CHO	1582,9 ± 60,5	7 ± 0	33 ± 0	60 ± 0
Refeições de alto CHO	2992,0 ± 565,8	75 ± 0	17 ± 0	8 ± 0

Valores representados em média ± desvio padrão. Composição de macronutrientes é representada como % da ingestão calórica total. Refeições de carboidrato normal (café da manhã + almoço); Refeições de baixo carboidrato (jantar + café da manhã); Refeições de alto carboidrato (drink + almoço + jantar); CHO: carboidrato, PTN: proteína, LIP: lipídeos.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, as duas estratégias de treinamento com BCGM resultaram em respostas adaptativas semelhantes para 1) PGC-1 α , proteínas componentes da cadeia de transporte de elétrons (complexo I-V); 2) atividade da CS; 3) respiração mitocondrial basal e máxima; 4) conteúdo mitocondriais e lipídico; 5) composição corporal; 6) parâmetros cardiorrespiratórios e 7) desempenho. No entanto, há uma redução significativa no estado 4 e um aumento no RCR na respiração mitocondrial apenas para o grupo duas vezes ao dia. Houve também uma maior efeito na redução da PSE durante o teste de carga constante para o grupo duas vezes ao dia.

O desenho experimental do presente estudo proporcionou aos grupos o mesmo volume total de exercícios, bem como uma distribuição de macronutrientes e ingestão energética total similar durante o período de treinamento (Fig. 4 e 5). Ainda, dados prévios do nosso grupo confirmam que a sessão de treinamento de *endurance* foi suficiente para reduzir os estoques de GM de maneira similar nos dois tipos de treinamento (Amorim-Souza *et al.*, dados não publicados). Dessa forma, é esperado uma redução de ~ 45% imediatamente antes da segunda sessão de treinamento (T1) nos dois grupos, atestando que qualquer diferença entre os grupos não poderia ser devido ao GM *per se*.

A via de sinalização do PGC-1 α , possui um papel central orquestrando muitas das adaptações oxidativas relacionadas ao exercício de *endurance*. No músculo esquelético o PGC-1 α é considerado o regulador mestre e o promotor da biogênese mitocondrial, de maneira que uma única sessão de exercício eleva a expressão gênica e/ou proteica do PGC-1 α (Mathai *et al.*, 2008). Em camundongos, a superexpressão muscular do PGC-1 α resulta em elevação do VO₂max, mudança do uso de carboidrato para gordura como combustível em exercícios submáximos, além de melhora no desempenho (Calvo *et al.*, 2008). No entanto, expressão proteica de PGC-1 α apresenta resultados contraditórios, neste estudo, a expressão proteica de PGC-1 α no músculo em repouso não mudou significativamente em resposta ao treinamento de 3 semanas, apesar de visualmente indicar uma mudança na ordem de 16%. Esses resultados coincidem com um estudo (Yeo *et al.*, 2008) e contrasta com outro (Morton *et al.*, 2009). Por outro lado, o exercício pode promover

modificações pós-tradução como fosforilação na treonina 177 e serina 538 e/ou deacetilação de PGC-1 α que também contribuem para a adaptação mitocondrial induzida pelo exercício e que poderia justificar a melhora no desempenho observada em ambos os grupos (Jager *et al.*, 2007; Canto *et al.*, 2010).

Do ponto de vista molecular o efeito resultante desejado pela biogênese mitocondrial é o aumento da quantidade de proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons que se localiza na membrana mitocondrial interna. Neste estudo, apesar da efetividade do treinamento em melhorar a capacidade aeróbia e performance, não foram encontradas nenhuma alteração induzida pelo treinamento BCGM nas subunidades representativas das proteínas do complexo I ao V (Fig. 8). No entanto, houve uma tendência para efeito do treino nos complexos I, II e IV. Esses dados indicam que pequenas mudanças na abundância de proteínas mitocondriais podem alterar a função mitocondrial.

Outros estudos avaliaram o efeito do treino BCGM na cadeia transportadora de elétrons, mais precisamente no complexo IV. Após três semanas de treinamento com BCGM um estudo que avaliou o complexo IV em suas subunidades II e IV encontrou efeito do treino duas vezes ao dia em relação ao controle apenas no complexo IV, subunidade IV (Yeo *et al.*, 2008). Ainda, seis semanas de treinamento foram capazes de elevar o complexo IV subunidade IV independente do conteúdo de glicogênio muscular (Morton *et al.*, 2009). Embora, estudos tenham demonstrado que o treinamento pode exercer uma resposta adaptativa no complexo IV, nosso estudo apresenta resultados semelhantes aos estudos de Hulston *et al.* (2010), onde não se observou efeito no complexo IV subunidades II e IV após três semanas de treinamento com BCGM.

Nosso estudo mostra resultados semelhantes no que concerne a atividade da CS, após três semanas de treinamento entre as situações pré e pós-treino quando realizado duas vezes ao dia ou diariamente. Esses dados estão em desacordo com estudos previamente publicados (Yeo *et al.*, 2008; Hulston *et al.*, 2010; Cochran *et al.*, 2015). A citrato sintase é amplamente aceita como marcador da capacidade aeróbia e conteúdo mitocondrial, isso se deve ao fato desta proteína ser uma das principais enzimas reguladoras na geração de energia, agindo como proteína chave do ciclo do ácido cítrico (Larsen *et al.*, 2012). No entanto, resultados controversos

são observados em treinamento de *endurance* de curta duração onde o não aumento da atividade da citrato sintase sugere que a melhora na capacidade aeróbia seja devido a melhora em fatores periféricos que precedem alterações no conteúdo mitocondrial, como por exemplo, aprimoramento na oferta de O₂ (Leek *et al.*, 2001). Por fim, indícios apontam para uma maior correlação entre nível de atividade física e função mitocondrial (avaliada pela respiração mitocondrial), em comparação ao conteúdo mitocondrial (avaliado pela atividade da citrato sintase), corroborando com nossos resultados (Bishop *et al.*, 2014).

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que usa microscopia eletrônica para abordar o papel do treinamento BCGM no conteúdo e na localização mitocondrial e lipídica. À medida que o treinamento com baixo glicogênio foi associado ao aumento da capacidade de oxidação da gordura e biogênese mitocondrial (Yeo *et al.*, 2008; Hulston *et al.*, 2010), era esperado um aumento no conteúdo mitocondrial e lipídico, visto que o treinamento de *endurance* prolongado (6-7 semanas) sem manipulação de GM resulta em incremento do conteúdo mitocondrial e lipídico no músculo esquelético (Tarnopolsky *et al.*, 2007; Meinild Lundby *et al.*, 2018) Assim, é provável que a ausência de mudanças significativas estruturais esteja relacionada ao tempo curto de treinamento realizado nesse estudo, o que está de acordo com a não alteração na atividade da CS.

De forma geral, os resultados moleculares indicam que há adaptações similares entre duas estratégias de treinamento com BCGM. O treinamento duas vezes ao dia permite que a segunda sessão de treino (1-2h de intervalo) seja executada com um prévio aumento de alguns genes induzidos pela primeira sessão de treino, promovendo uma expressão mais acentuada desses genes após a segunda sessão de treino, o que poderia levar a uma potencialização das adaptações ao treinamento. Por outro lado, a restrição prolongada de CHO (14 h) após as sessões de treinamento de *endurance* estende a duração da ativação transcricional de genes específicos envolvidos na biogênese mitocondrial e utilização de combustível muscular que sustentam a adaptação ao treinamento. Esses resultados indicam que, por meios diferentes, os dois tipos de treino promovem adaptações moleculares semelhantes.

Entretanto, o presente estudo demonstra pela primeira vez uma diminuição significativa no estado 4 da respiração mitocondrial, acompanhada por aumento no RCR no treinamento de duas vezes por dia em comparação com o treino diário (Fig. 10). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem aumento na eficiência mitocondrial que pode ser explicada pela redução do vazamento/deslizamento de prótons através da membrana mitocondrial interna. A oxidação de nutrientes fornece elétrons para cadeia transportadora de elétrons na forma de NADH e FADH₂, o trânsito desses elétrons pelos componentes da cadeia promove a extrusão de prótons da matriz mitocondrial em direção ao espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico (diferença de carga e pH) transmembrana. A energia fornecida pela reentrada de prótons pelo complexo V é finalmente usada para produzir ATP para funções celulares. No entanto, o potencial da membrana mitocondrial pode ser dissipado por outros meios (vazamento/deslizamento) que não a fosforilação de ADP, logo, a oxidação não é 100% acoplada à produção de ATP. Esse evento pode ser medido pelo estado 4 da respiração mitocondrial, sendo, portanto, um indicativo de eficiência mitocondrial (Liesa e Shirihai, 2013).

Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior comparando indivíduos sedentários e treinados (Zoll *et al.*, 2002; Daussin *et al.*, 2008) e sugerem um aumento no acoplamento entre a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação (melhora da eficiência mitocondrial). Essa diferença permaneceu significativa mesmo quando a atividade de CS foi usada como base de referência, o que sugere que a função mitocondrial foi significativamente mais eficiente para o treinamento duas vezes ao dia.

Entretanto, a maior eficiência mitocondrial não foi suficiente para alterar as respostas fisiológicas sistêmicas e o desempenho. Os dois treinamentos com BCGM melhoraram o desempenho, como avaliado pelo aumento significativo da potência média durante teste contrarrelógio de 48 kJ (Fig. 7). Esse efeito é paralelo a melhora em todos os parâmetros de capacidade aeróbica medidas pelo teste incremental (Tabela 3). As melhorias de desempenho observadas no teste incremental foram acompanhadas por reduções significativas na FC, PSE, VO₂, VE e VCO₂ durante o teste de *endurance* de carga constante de 100 min realizado na mesma carga de trabalho absoluta. O custo de oxigênio e o acúmulo de lactato foram reduzidos para ambos os grupos, indicando uma diminuição no custo relativo de energia de uma

determinada intensidade de exercício. Assim, os dois tipos de treinamento levam a adaptações fisiológicas similares.

Por último, um resultado interessante e imprevisível foi que o treinamento duas vezes ao dia foi mais eficaz na redução da PSE durante o exercício de carga constante, quando comparado ao treino diariamente. A PSE parece aumentar de forma proporcional ao nível de atividade elétrica do músculo e pode ser uma ferramenta útil para a medição indireta da fadiga (Carroll *et al.*, 2017). É possível que, ao contrário do treinamento diariamente, ao realizar a segunda sessão de treino com um curto tempo de recuperação (2 h), os indivíduos ainda estão sob maior efeito de fadiga central e periférica (Ross *et al.*, 2007). Logo, isso poderia resultar em maior esforço do sistema nervoso central durante o TI e, como resultado, em melhor adaptação à tolerância ao exercício, levando a uma maior redução na PSE para a mesma carga absoluta. Os mecanismos de fadiga central não foram avaliados nesse estudo, o que garante futuras investigações.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo é o primeiro a comparar duas estratégias de treinamento com BCGM (treinamento duas vezes ao dia e diariamente). Nossos resultados sugerem que as duas estratégias de treinamento promovem adaptações semelhantes. Por outro lado, dois resultados ganham destaque em relação ao efeito do exercício prévio 1) a redução no estado 4 da respiração mitocondrial indica um efeito superior do treino sob efeito do exercício prévio (duas vezes ao dia) no ganho da eficiência mitocondrial; 2) o fato da PSE ser menor no treinamento realizado duas vezes ao dia pode indicar uma provável vantagem dessa estratégia no que concerne a mecanismos para redução da sensação de fadiga.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo indica que as duas estratégias de treinamento com baixo glicogênio resultaram em adaptações fisiológicas semelhantes. Entretanto, o efeito do treinamento duas vezes ao dia aumentou a eficiência mitocondrial. Estudos futuros devem, portanto, investigar qual via(s) de sinalização estariam relacionadas com a redução no vazamento/deslizamento mitocondrial. Outro ponto interessante foi a maior redução na PSE para a mesma carga absoluta no grupo que treinou duas vezes ao dia. Dessa forma, investigações futuras com o objetivo de avaliar os mecanismos responsáveis pela maior redução na PSE com o treinamento duas vezes ao dia, e sua possível relação com a redução da fadiga central e/ou periférica deveriam ser conduzidos.

REFERÊNCIAS

ADHIHETTY, P. J.; IRRCHER, I.; JOSEPH, A. M.; LJUBICIC, V.; HOOD, D. A. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. **Exp Physiol**, v. 88, n. 1, p. 99-107, 2003.

ARMSTRONG, N.; BARKER, A. R. Endurance training and elite young athletes. **Med Sport Sci**, v. 56, p. 59-83, 2011.

BALDELLI, S.; LETTIERI BARBATO, D.; TATULLI, G.; AQUILANO, K.; CIRIOLO, M. R. The role of nNOS and PGC-1alpha in skeletal muscle cells. **J Cell Sci**, v. 127, n. Pt 22, p. 4813-20, 2014.

BERARDI, J. M.; PRICE, T. B.; NOREEN, E. E.; LEMON, P. W. Postexercise muscle glycogen recovery enhanced with a carbohydrate-protein supplement. **Med Sci Sports Exerc**, v. 38, n. 6, p. 1106-13, 2006.

BERGSTROM, J. Muscle electrolytes in man. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 14, n. 68, 1962.

BERGSTROM, J.; HULTMAN, E. Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. **Nature**, v. 210, n. 5033, p. 309-10, 1966.

BISHOP, D.; JENKINS, D. G.; MACKINNON, L. T. The relationship between plasma lactate parameters, W_{peak} and 1-h cycling performance in women. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 8, p. 1270-5, 1998.

BISHOP, D. J.; GRANATA, C.; EYNON, N. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 4, p. 1266-75, 2014.

BISHOP, D. J.; THOMAS, C.; MOORE-MORRIS, T.; TONKONOGLI, M.; SAHLIN, K.; MERCIER, J. Sodium bicarbonate ingestion prior to training improves mitochondrial adaptations in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 299, n. 2, p. E225-33, 2010.

BOOTH, F. W., AND BALDWIN, K.M. Muscle Plasticity: energy demand and supply processes. In: L.B. ROWELL, A. J. T. S. (Ed.). **Handbook of Physiology. Section 12: Exercise: Regulation and Intergration of Multiple Systems**. New York: Oxford University Press, 1996. p.1075- 1123.

BOOTH, F. W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. **Physiol Rev**, v. 71, n. 2, p. 541-85, 1991.

BORSHEIM, E.; BAHR, R. Effect of exercise intensity, duration and mode on post-exercise oxygen consumption. **Sports Med**, v. 33, n. 14, p. 1037-60, 2003.

CALVO, J. A.; DANIELS, T. G.; WANG, X.; PAUL, A.; LIN, J.; SPIEGELMAN, B. M.; STEVENSON, S. C.; RANGWALA, S. M. Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. **J Appl Physiol (1985)**, v. 104, n. 5, p. 1304-12, 2008.

CANTO, C.; JIANG, L. Q.; DESHMUKH, A. S.; MATAKI, C.; COSTE, A.; LAGOUGE, M.; ZIERATH, J. R.; AUWERX, J. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. **Cell Metab**, v. 11, n. 3, p. 213-9, 2010.

CARROLL, T. J.; TAYLOR, J. L.; GANDEVIA, S. C. Recovery of central and peripheral neuromuscular fatigue after exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 122, n. 5, p. 1068-1076, 2017.

COCHRAN, A. J.; MYSLIK, F.; MACINNIS, M. J.; PERCIVAL, M. E.; BISHOP, D.; TARNOPOLSKY, M. A.; GIBALA, M. J. Manipulating Carbohydrate Availability Between Twice-Daily Sessions of High-Intensity Interval Training Over 2 Weeks Improves Time-Trial Performance. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 25, n. 5, p. 463-70, 2015.

COFFEY, V. G.; MOORE, D. R.; BURD, N. A.; RERECICH, T.; STELLINGWERFF, T.; GARNHAM, A. P.; PHILLIPS, S. M.; HAWLEY, J. A. Nutrient provision increases signalling and protein synthesis in human skeletal muscle after repeated sprints. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 7, p. 1473-83, 2011.

COSTILL, D. L.; GOLLNICK, P. D.; JANSSON, E. D.; SALTIN, B.; STEIN, E. M. Glycogen depletion pattern in human muscle fibres during distance running. **Acta Physiol Scand**, v. 89, n. 3, p. 374-83, 1973.

CRICK, F. Central dogma of molecular biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561-3, 1970.

DAUSSIN, F. N.; ZOLL, J.; PONSOT, E.; DUFOUR, S. P.; DOUTRELEAU, S.; LONSDORFER, E.; VENTURA-CLAPIER, R.; METTAUER, B.; PIQUARD, F.; GENY, B.; RICHARD, R. Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 104, n. 5, p. 1436-41, 2008.

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. **J Appl Physiol** (1985), v. 101, n. 3, p. 918-25, 2006.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metab**, v. 17, n. 2, p. 162-84, 2013.

GOLLNICK, P. D.; ARMSTRONG, R. B.; SEMBROWICH, W. L.; SHEPHERD, R. E.; SALTIN, B. Glycogen depletion pattern in human skeletal muscle fibers after heavy exercise. **J Appl Physiol**, v. 34, n. 5, p. 615-8, 1973.

GOLLNICK, P. D.; PIEHL, K.; SALTIN, B. Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibres after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates. **J Physiol**, v. 241, n. 1, p. 45-57, 1974.

HANSEN, A. K.; FISCHER, C. P.; PLOMGAARD, P.; ANDERSEN, J. L.; SALTIN, B.; PEDERSEN, B. K. Skeletal muscle adaptation: training twice every second day vs. training once daily. **J Appl Physiol** (1985), v. 98, n. 1, p. 93-9, 2005.

HARDIE, D. G.; SAKAMOTO, K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 48-60, 2006.

HAWLEY, J. A.; HARGREAVES, M.; JOYNER, M. J.; ZIERATH, J. R. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738-49, 2014.

HAWLEY, J. A.; HARGREAVES, M.; ZIERATH, J. R. Signalling mechanisms in skeletal muscle: role in substrate selection and muscle adaptation. **Essays Biochem**, v. 42, p. 1-12, 2006.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 242, n. 9, p. 2278-82, 1967.

HOWLEY, E. T.; BASSETT, D. R., JR.; WELCH, H. G. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, n. 9, p. 1292-301, 1995.

HULSTON, C. J.; VENABLES, M. C.; MANN, C. H.; MARTIN, C.; PHILP, A.; BAAR, K.; JEUKENDRUP, A. E. Training with low muscle glycogen enhances fat metabolism in well-trained cyclists. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 11, p. 2046-55, 2010.

JACKSON, A. S.; POLLOCK, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. **Br J Nutr**, v. 40, n. 3, p. 497-504, 1978.

JAGER, S.; HANDSCHIN, C.; ST-PIERRE, J.; SPIEGELMAN, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 29, p. 12017-22, 2007.

JENTJENS, R.; JEUKENDRUP, A. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. **Sports Med**, v. 33, n. 2, p. 117-44, 2003.

JEUKENDRUP, A. E. Periodized Nutrition for Athletes. **Sports Med**, v. 47, n. Suppl 1, p. 51-63, 2017.

KIENS, B.; ESSEN-GUSTAVSSON, B.; CHRISTENSEN, N. J.; SALTIN, B. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. **J Physiol**, v. 469, p. 459-78, 1993.

KIENS, B.; RICHTER, E. A. Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in humans. **Am J Physiol**, v. 275, n. 2 Pt 1, p. E332-7, 1998.

KUIPERS, H.; VERSTAPPEN, F. T.; KEIZER, H. A.; GEURTEN, P.; VAN KRANENBURG, G. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. **Int J Sports Med**, v. 6, n. 4, p. 197-201, 1985.

LAGE, R.; DIEGUEZ, C.; VIDAL-PUIG, A.; LOPEZ, M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. **Trends Mol Med**, v. 14, n. 12, p. 539-49, 2008.

LANE, S. C.; CAMERA, D. M.; LASSITER, D. G.; ARETA, J. L.; BIRD, S. R.; YEO, W. K.; JEACOCKE, N. A.; KROOK, A.; ZIERATH, J. R.; BURKE, L. M.; HAWLEY, J. A. Effects of sleeping with reduced carbohydrate availability on acute training responses. **J Appl Physiol (1985)**, v. 119, n. 6, p. 643-55, 2015.

LARSEN, S.; NIELSEN, J.; HANSEN, C. N.; NIELSEN, L. B.; WIBRAND, F.; STRIDE, N.; SCHRODER, H. D.; BOUSHEL, R.; HELGE, J. W.; DELA, F.; HEY-MOGENSEN, M. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **J Physiol**, v. 590, n. 14, p. 3349-60, 2012.

LEEK, B. T.; MUDALIAR, S. R.; HENRY, R.; MATHIEU-COSTELLO, O.; RICHARDSON, R. S. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 2, p. R441-7, 2001.

LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell Metab**, v. 17, n. 4, p. 491-506, 2013.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab**, v. 1, n. 6, p. 361-70, 2005.

LITTLE, J. P.; SAFDAR, A.; WILKIN, G. P.; TARNOPOLSKY, M. A.; GIBALA, M. J. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 6, p. 1011-22, 2010.

LUQUET, S.; LOPEZ-SORIANO, J.; HOLST, D.; FREDENRICH, A.; MELKI, J.; RASSOULZADEGAN, M.; GRIMALDI, P. A. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. **FASEB J**, v. 17, n. 15, p. 2299-301, 2003.

MARQUET, L. A.; BRISSWALTER, J.; LOUIS, J.; TIOLLIER, E.; BURKE, L. M.; HAWLEY, J. A.; HAUSSWIRTH, C. Enhanced Endurance Performance by Periodization of Carbohydrate Intake: "Sleep Low" Strategy. **Med Sci Sports Exerc**, v. 48, n. 4, p. 663-72, 2016.

MATHAI, A. S.; BONEN, A.; BENTON, C. R.; ROBINSON, D. L.; GRAHAM, T. E. Rapid exercise-induced changes in PGC-1alpha mRNA and protein in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 105, n. 4, p. 1098-105, 2008.

MCBRIDE, A.; GHILAGABER, S.; NIKOLAEV, A.; HARDIE, D. G. The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. **Cell Metab**, v. 9, n. 1, p. 23-34, 2009.

MEINILD LUNDBY, A. K.; JACOBS, R. A.; GEHRIG, S.; DE LEUR, J.; HAUSER, M.; BONNE, T. C.; FLUCK, D.; DANDANELL, S.; KIRK, N.; KAECH, A.; ZIEGLER, U.; LARSEN, S.; LUNDBY, C. Exercise training increases skeletal muscle mitochondrial volume density by enlargement of existing mitochondria and not de novo biogenesis. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 222, n. 1, 2018.

MISHRA, P.; CHAN, D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. **J Cell Biol**, v. 212, n. 4, p. 379-87, 2016.

MORTON, J. P.; CROFT, L.; BARTLETT, J. D.; MACLAREN, D. P.; REILLY, T.; EVANS, L.; MCARDLE, A.; DRUST, B. Reduced carbohydrate availability does not modulate training-induced heat shock protein adaptations but does upregulate oxidative enzyme activity in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 106, n. 5, p. 1513-21, 2009.

MURPHY, R. M.; LAMB, G. D. Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. **J Physiol**, v. 591, n. 23, p. 5823-31, 2013.

NIELSEN, J.; GEJL, K. D.; HEY-MOGENSEN, M.; HOLMBERG, H. C.; SUETTA, C.; KRUSTRUP, P.; ELEMANS, C. P. H.; ORTENBLAD, N. Plasticity in mitochondrial cristae density allows metabolic capacity modulation in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 595, n. 9, p. 2839-2847, 2017.

NIELSEN, J.; MOGENSEN, M.; VIND, B. F.; SAHLIN, K.; HOJLUND, K.; SCHRODER, H. D.; ORTENBLAD, N. Increased subsarcolemmal lipids in type 2 diabetes: effect of training on localization of lipids, mitochondria, and glycogen in sedentary human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 3, p. E706-13, 2010.

PERRY, C. G.; LALLY, J.; HOLLOWAY, G. P.; HEIGENHAUSER, G. J.; BONEN, A.; SPRIET, L. L. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 23, p. 4795-810, 2010a.

_____. Repeated transient mRNA bursts precede rapid exercise-induced changes in PGC-1 mRNA and protein in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 23, p. 4795-810, 2010b.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. **Methods Mol Biol**, v. 810, p. 25-58, 2012.

PHILP, A.; BURKE, L. M.; BAAR, K. Altering endogenous carbohydrate availability to support training adaptations. **Nestle Nutr Inst Workshop Ser**, v. 69, p. 19-31; discussion 31-7, 2011.

PILEGAARD, H.; KELLER, C.; STEENBERG, A.; HELGE, J. W.; PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. **J Physiol**, v. 541, n. Pt 1, p. 261-71, 2002.

PILEGAARD, H.; OSADA, T.; ANDERSEN, L. T.; HELGE, J. W.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Substrate availability and transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle during recovery from exercise. **Metabolism**, v. 54, n. 8, p. 1048-55, 2005.

POGOZELSKI, A. R.; GENG, T.; LI, P.; YIN, X.; LIRA, V. A.; ZHANG, M.; CHI, J. T.; YAN, Z. p38gamma mitogen-activated protein kinase is a key regulator in skeletal muscle metabolic adaptation in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7934, 2009.

ROSS, E. Z.; MIDDLETON, N.; SHAVE, R.; GEORGE, K.; NOWICKY, A. Corticomotor excitability contributes to neuromuscular fatigue following marathon running in man. **Exp Physiol**, v. 92, n. 2, p. 417-26, 2007.

SHIRREFFS, S. M.; TAYLOR, A. J.; LEIPER, J. B.; MAUGHAN, R. J. Post-exercise rehydration in man: effects of volume consumed and drink sodium content. **Med Sci Sports Exerc**, v. 28, n. 10, p. 1260-71, 1996.

SPRIET, L. L. New insights into the interaction of carbohydrate and fat metabolism during exercise. **Sports Med**, v. 44 Suppl 1, p. S87-96, 2014.

TARNOPOLSKY, M. A.; RENNIE, C. D.; ROBERTSHAW, H. A.; FEDAK-TARNOPOLSKY, S. N.; DEVRIES, M. C.; HAMADEH, M. J. Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 3, p. R1271-8, 2007.

TAYLOR, C.; BARTLETT, J. D.; VAN DE GRAAF, C. S.; LOUHELAINEN, J.; COYNE, V.; IQBAL, Z.; MACLAREN, D. P.; GREGSON, W.; CLOSE, G. L.; MORTON, J. P. Protein ingestion does not impair exercise-induced AMPK signalling when in a glycogen-depleted state: implications for train-low compete-high. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 6, p. 1457-68, 2013.

VIEIRA, J. S.; SARAIVA, K. L.; BARBOSA, M. C.; PORTO, R. C.; CRESTO, J. C.; PEIXOTO, C. A.; WANDERLEY, M. I.; UDRISAR, D. P. Effect of dexamethasone and testosterone treatment on the regulation of insulin-degrading enzyme and cellular changes in ventral rat prostate after castration. **Int J Exp Pathol**, v. 92, n. 4, p. 272-80, 2011.

WIBOM, R.; HULTMAN, E.; JOHANSSON, M.; MATHEREI, K.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; SCHANTZ, P. G. Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. **J Appl Physiol (1985)**, v. 73, n. 5, p. 2004-10, 1992.

YEO, W. K.; MCGEE, S. L.; CAREY, A. L.; PATON, C. D.; GARNHAM, A. P.; HARGREAVES, M.; HAWLEY, J. A. Acute signalling responses to intense endurance training commenced with low or normal muscle glycogen. **Exp Physiol**, v. 95, n. 2, p. 351-8, 2010.

YEO, W. K.; PATON, C. D.; GARNHAM, A. P.; BURKE, L. M.; CAREY, A. L.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle adaptation and performance responses to once a day versus twice every second day endurance training regimens. **J Appl Physiol** (1985), v. 105, n. 5, p. 1462-70, 2008.

ZOLL, J.; SANCHEZ, H.; N'GUESSAN, B.; RIBERA, F.; LAMPERT, E.; BIGARD, X.; SERRURIER, B.; FORTIN, D.; GENY, B.; VEKSLER, V.; VENTURA-CLAPIER, R.; METTAUER, B. Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 1, p. 191-200, 2002.

APÊNDICE 1. 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 “*EXPRESSÃO GÊNICA E ADAPTAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TREINAMENTO COM BAIXO GLICOGÊNIO MUSCULAR*”.

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 o treinamento com conteúdo de glicogênio muscular reduzido melhora o desempenho no exercício físico;
- Que a importância deste estudo é investigar as adaptações crônicas causadas pelo treinamento em diferentes estratégias de redução do conteúdo de glicogênio muscular, sobre o desempenho em uma prova de ciclismo contra-relógio de 47.8 kJ. 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 Março de 2016, com previsão de término para Dezembro de 2016, mas eu estou ciente que a minha participação resume-se três semanas de treinamento mais duas avaliações preliminares, duas avaliações antes e duas avaliações após o período de treinamento.

- Que o estudo será feito da seguinte maneira: Eu deverei visitar o laboratório de Fisiologia do Exercício do Centro Acadêmico de Vitória, CAV/UFPE, vinte e duas 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 aproximada de 30 minutos. Na visita 2, realizarei um exercício de 100 min em carga constante e a execução da prova contra-relógio de ciclismo de 47.8 kj. Posteriormente, serei selecionado para participar das dezoito sessões de treinamento dentro de um período de 3 semanas. Poderei treinar em um dos seguintes grupos, a depender do sorteio: 1) uma vez diariamente, 6 dias por semana de segunda a sábado, sendo na noite de um dia e na manhã seguinte do outro, com um período de aproximadamente 16h de recuperação entre as sessões. Durante esse período de recuperação irei consumir duas refeições contendo 7 % CHO, 60 % lipídios e 33 % proteínas cada uma, ou; 3) duas vezes no mesmo dia, 3 dias por semana de segunda, quarta e sexta-feira, sendo duas sessões de treino realizadas pela manhã e separadas por um período de 2h. Durante esse período de recuperação irei consumir somente água. As sessões de treinamento constituirão de uma sessão de treino de carga fixa e outra de treino intervalado, onde terá períodos de alta intensidade e repouso. As duas sessões juntas terão duração de aproximadamente 135 minutos. Nas duas sessões após o período de treinamento realizarei novamente os exercícios de carga constante e contra-relógio de ciclismo de 47.8 k.j
- 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 durante a primeira visita e quarenta e oito horas após o período de treinamento, 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 biópsia 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 imediatamente antes e após as provas contra-relógio de ciclismo pré e pós treinamento, serão coletados 50 microlitros de sangue arterializado do lóbulo da orelha. Antes e após os exercícios de carga constante de 100 min serão coletados amostras de 8 mililitros de sangue venoso. Assim, antes do início do protocolo, um cateter será fixado na minha veia do braço com infusão periódica de salina estéril para evitar a coagulação e obstrução da passagem do sangue pelo cateter.
- Que existem riscos 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: 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: caso eu tenha algum problema, eu serei transportado de ambulância pública ou de automóvel particular para o hospital público 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 treinamentos 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 extra-judicial.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNETÁRIO

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 glicigênio muscular reduzido” – Estudo 1, 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 participante: _____

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

02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

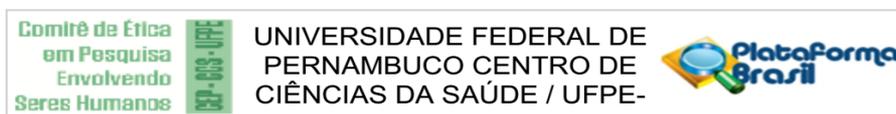
Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO 1. 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

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

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

CEP - CCS - UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

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

Versão: 3

CAAE: 30378414.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 016479/2016

Patrocinador Principal: CNPQ

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

E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO 2. Autorização para uso de figuras.

RightsLink Printable License

1/19/18, 8:53 AM

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 19, 2018

This Agreement between Ms. Thaysa Ghiarone ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4272520173179
License date	Jan 19, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cell Metabolism
Licensed Content Title	SnapShot: Exercise Metabolism
Licensed Content Author	Brendan Egan,John A. Hawley,Juleen R. Zierath
Licensed Content Date	Aug 9, 2016
Licensed Content Volume	24
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	2
Start Page	342
End Page	342.e1
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	Português
Original figure numbers	Figures 1
Title of your thesis/dissertation	Adaptações moleculares, funcionais e morfológicas relacionadas ao treinamento com baixo glicogênio muscular: treino duas vezes ao dia versus treino diário
Expected completion date	Feb 2018
Estimated size (number of pages)	80
Requestor Location	Ms. Thaysa Ghiarone Conjunto alfredo gaspar de mendonça bl30, apt 103

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 19, 2018

This Agreement between Ms. Thaysa Ghiarone ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4272511124774
License date	Jan 19, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Physiology
Licensed Content Title	Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle
Licensed Content Author	Christopher G. R. Perry,James Lally,Graham P. Holloway,George J. F. Heigenhauser,Arend Bonen,Lawrence L. Spriet
Licensed Content Date	Nov 30, 2010
Licensed Content Pages	16
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Fig 7
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Português
Title of your thesis / dissertation	Adaptações moleculares, funcionais e morfológicas relacionadas ao treinamento com baixo glicogênio muscular: treino duas vezes ao dia versus treino diário
Expected completion date	Feb 2018
Expected size (number of pages)	80
Requestor Location	Ms. Thaysa Ghiarone Conjunto alfredo gaspar de mendonça bl30, apt 103 Maceió, Alagoas 57038540 Brazil Attn: Ms. Thaysa Ghiarone
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 19, 2018

This Agreement between Ms. Thaysa Ghiarone ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4272511124774
License date	Jan 19, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Physiology
Licensed Content Title	Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle
Licensed Content Author	Christopher G. R. Perry,James Lally,Graham P. Holloway,George J. F. Heigenhauser,Arend Bonen,Lawrence L. Spriet
Licensed Content Date	Nov 30, 2010
Licensed Content Pages	16
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Fig 7
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Português
Title of your thesis / dissertation	Adaptações moleculares, funcionais e morfológicas relacionadas ao treinamento com baixo glicogênio muscular: treino duas vezes ao dia versus treino diário
Expected completion date	Feb 2018
Expected size (number of pages)	80
Requestor Location	Ms. Thaysa Ghiarone Conjunto alfredo gaspar de mendonça bl30, apt 103 Maceió, Alagoas 57038540 Brazil Attn: Ms. Thaysa Ghiarone
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD