MAYSA VIEIRA DE SOUSA

Suplementação com carboidratos durante treinamento intensivo aumenta as concentrações de lipídios intramiocelulares e reduz os marcadores de lesão tecidual em corredores competitivos: interação hormonal e metabólica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa, Maysa Vieira de
Suplementação com carboidratos durante treinamento intensivo aumenta as concentrações de lipídeos intramiocelulares e reduz os marcadores de lesão tecidual em corredores competitivos : interação hormonal e metabólica / Maysa Vieira de Sousa. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Carboidratos 2.Hormônio 3.Testosterona 4.Insulina 5.L-lactato desidrogenase 6.Desempenho atlético 7.DNA 8.Espectroscopia de ressonância magnética

USP/FM/DBD-462/10

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio – LIM 18, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com período de estágio no Instituto de Ciências do Esporte da Universidade de Aarhus, Dinamarca.

Agradecemos a FAPESP, pelo auxílio e bolsa outorgada (Processo FAPESP: nº 2007/08747-7).

DEDICATÓRIA

A Deus, pela minha vida, por me proteger e por iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, Maria Amélia Vieira de Sousa e José Vicente de Sousa, por tornarem tudo possível, e por inúmeros motivos dos quais vou tentar expressar alguns deles que são ensinamentos, tolerância, afeto e principalmente amor.

AGRADECIMENTOS

É com muita emoção que divido esse momento de realização pessoal e profissional com todas as pessoas que me auxiliaram durante esses três anos de dedicação ao doutorado. Expresso os meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva, a quem também dedico esse trabalho, pela valiosa orientação durante esses anos de convivência, seja in loco, por e-mail, por telefone, ou à distância, durante período de estágio na Dinamarca, e, principalmente, por alimentar ainda mais minha curiosidade e vontade de pesquisar. Obrigada por ser uma máquina de motivação. Quero agradecê-la também pela oportunidade de desfrutar de sua equipe de trabalho, pelas dicas e pelas enriquecedoras discussões em ciências endócrinas e condutas clínicas. Momentos fantásticos. Agradeço por essa oportunidade única. Por fim, quero parabenizá-la pela paciência, compreensão e pelo seu profissionalismo.

Ao meu supervisor do Instituto de Ciências do Esporte da Universidade de Aarhus, Dinamarca, Prof. Dr. Klavs Madsen, pelas valiosas discussões em fisiologia do exercício, e por despertar ainda mais meu interesse na área de exercício. Agradeço pelo período de estágio em seu laboratório, pelas pesquisas realizadas com os ciclistas – inesquecíveis - pela minha estadia com você e toda equipe de trabalho. Sou muito grata. Sem dúvida, uma experiência única. Agradeço também pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Herbert Gustavo Simões, pelo incentivo, contribuição na minha formação acadêmica e orientação durante todos esses anos desde que nos conhecemos. Quero também parabenizá-lo pela exemplar produção científica do seu grupo de trabalho.

Ao Prof. Dr. Peter Krustrup, do Departamento de Exercício e Ciências do Esporte, da Universidade de Copenhague, um agradecimento especial, pela oportunidade de conhecer o seu laboratório, pelos momentos valiosos com você e equipe, e por estimular meu interesse e ampliar meus horizontes na área do exercício.

À Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira, do Laboratório de Metabolismo Ósseo (LIM 17), pela valiosa colaboração nesse estudo, por estar sempre disposta a ajudar e pelos auxílios concedidos desde a época do mestrado.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão e equipe de trabalho do InCor, pela valiosa colaboração, disponibilizando o seu laboratório para a avaliação da capacidade cardiorrespiratória dos atletas deste estudo.

Ao Prof. Dr. Claudio Campi, da seção de Ressonância Magnética do InCor, pela colaboração neste estudo ao avaliar o exame de imagem e espectroscopia dos atletas.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli do Instituto Butantã pela colaboração neste estudo e pelos conselhos profissionais.

À Profa. Dra. Dalva Marreiro Rocha, pelo carisma, conselhos, experiência, incentivo, preocupação e curiosidade com o tema da minha tese.

À Profa. Dra. Rosa Ferreira dos Santos, pela curiosidade com o tema da minha tese e pelos ensinamentos envolvendo resistência à insulina. Quero agradecê-la também pelo incentivo.

À Maria José Pegoraro, um agradecimento especial, por me incentivar e conduzir ao LIM-18 para a realização do doutorado e pela ajuda concedida nesses anos.

À Rosinha Fukui, um agradecimento especial, pela experiência, cuidado e auxílio na coleta das amostras sanguíneas e nas determinações experimentais. Quero agradecê-la pela sua dedicação ao LIM18, pela sua paciência e pelo árduo trabalho com as determinações dos meus estudos.

À Aritania Souza Santos, pela habilidade técnica e auxílio nesse trabalho. Também quero agradecê-la pela fantástica companhia no congresso da *ADA* 2010.

À Maria de Fátima Sanches, Greci Paula, Marcia Correia, Adriana Rosa, Maria do Carmo Arruda e Fernanda Rossi do LIM 18, pela colaboração durante a execução desse estudo.

Aos pós-graduandos Katia Nogueira, Lindiane Crisostomo, Teresa Mattana, Renata Matiello, Vinicius Costa e Debora Mainardi, pelos momentos de descontração, discussão científica e amizade.

À pós-graduanda Jéssica Fores, fofíssima, por ter ingressado comigo na pós-graduação da Endocrinologia, pela meiguice e por estar sempre disposta a ajudar.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça, pelo exemplo profissional, grande estímulo aos pós-graduandos e pelas discussões científicas nas reuniões do Programa de Endocrinologia.

Às Profas. Ana Claudia Latronico e Sandra Villares, pelo incentivo e pela participação e contribuição no exame de qualificação do doutorado.

À todos os funcionários das Secretarias da Endocrinologia, em especial à Cida e ao Rubens, pela eficiência e atenção.

Ao corpo docente do programa de Endocrinologia, pelas discussões científicas na reunião do INTRAMUROS.

À Dra. Emilia Modolo Pinto, pelas dicas em genética fornecidas no início desse projeto.

À Valéria Samuel Lando e equipe do LIM 42, por terem colaborado com as análises hormonais e pela dedicação.

À Profa. Dra. Leila Antonangelo e à Karina Lima Spedo, da Diretoria do Laboratório Central do Hospital das Clínicas, pelas orientações referentes à coleta sanguínea e à organização dos resultados processados.

Às funcionárias Cristina Cardoso e Marli, do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do InCor, por terem colaborado com as análises de catecolaminas desse estudo.

À Lilian Takayama e à Valéria de Falco Caparbo, do LIM 17, pela valiosa colaboração com o exame de densitometria óssea e análises imunológicas.

À nutricionista Silvia Terue, pelo auxílio do cálculo nutricional das dietas.

À nutricionista, Cristina Marques, da seção de Nutrição e Dietética do Hospital das Clínicas, pelas dietas fornecidas aos voluntários desse estudo.

À Profa. Dra. Miriam Coelho de Souza, grande incentivadora, que admiro e tenho muita estima, pela atenção e pela contribuição na minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Marlene Trigo, por compartilhar suas vivências, pelo incentivo e amizade.

Ao Carlos Werner e família, pelo incentivo e amizade.

Aos meus irmãos Joana D´Arc, Tarcísio Felipe, Danilo Tadeu e Adriano, e aos meus sobrinhos, Érika, Matheus e Enzo, pelos momentos de descontração, apoio, carinho e amizade, que mesmo tão distantes estão presentes em meus pensamentos.

À Claire Elizabeth Neesham, pela revisão do inglês dos meus artigos, pelos ensinamentos, pela simplicidade, carisma e motivação.

Ao Allan Bo Jørgensen, pela ajuda durante minha estadia na Dinamarca e pela revisão do inglês.

Ao Dr. Niels Pallisgaard, do *Vejle Hospital*, Dinamarca, pela contribuição no estudo genético.

Aos Profs. Klavs Madsen e Henrik Sørensen, da Universidade de Aarhus, Dinamarca, e, Isac de Castro, da FMUSP, pela ajuda e atenção no tratamento estatístico desse estudo.

Ao Dr. Jesper Franch, meu companheiro de trabalho na Dinamarca, por estar sempre disposto a ajudar, pelas valiosas discussões na área de fisiologia do exercício, pelo período de pesquisa na cidade de Faaborg avaliando os ciclistas e pelos livros emprestados.

Aos mestrandos Rene Schmidt e Jacob Agger Troelsen, e à biomédica Annette Bache Nielsen, pelo período que trabalhamos com os ciclistas.

Aos Profs. Dr. Kristian Overgaard e Thorsten Hansen, pelos conhecimentos transmitidos.

À Profa. Dorte Stenderup, pelos ensinamentos do idioma dinamarquês e por estar sempre disposta a ajudar, incondicionalmente.

Aos meus amigos e vizinhos do Collegium onde residi, em especial à Louise Poulsen, pelos valiosos momentos de descontração, pela troca cultural e amizade.

Aos técnicos de atletismo Adauto Domingues, Edelson e Claudio Castilho, pelo apoio na concretização desse trabalho e por ter proporcionado o convívio com atletas de alto rendimento.

Ao Sr. Eduardo Anastaci, da Secretaria de Esporte, Lazer e Turismo “Constâncio Vaz Guimarães”, por ter disponibilizado a pista de atletismo do Ibirapuera para a realização dos testes.

Ao biólogo João Carlos, e ao auxiliar de enfermagem Wagner Teixeira Moizinho, pela contribuição na realização das coletas de sangue durante a sessão experimental desse estudo.

Aos amigos Noriko Takehara, Claudemir Tarto e toda equipe de apoio, um agradecimento especial, pelo auxílio durante a coleta de dados desse estudo e pelos momentos de descontração.

Aos voluntários que participaram da pesquisa, meu agradecimento especial. Por questões de privacidade, não posso citá-los. Saibam que vocês foram as pessoas mais importantes para a realização deste estudo. Quero agradecê-los por terem acreditado nos meus ensinamentos como nutricionista, pela motivação, pelos momentos de descontração e, principalmente, por serem sempre minha fonte de inspiração.

Aos atletas Marilson Santos, Juliana Santos, Maurren Maggi e Clodoaldo G. da Silva, um agradecimento especial pelo que vocês representam no mundo esportivo.

Aos ex-alunos das universidades UMC, UNIMEP (campus Lins e Piracicaba), em especial aos seguidores da Nutrição Esportiva, e da Educação Nutricional, meus orientandos de TCC, e monitores das disciplinas de Avaliação Nutricional e Projeto Interdisciplinar, dentre eles Rafaela Bormio, Juliana Ribeiro, Alessandra Schiavon, Glaucia Nogueira, Juliana Monteiro, Gustavo Pimentel, Silvia Terue, Elaine Reis, Bruno Moura, Mauro Takahashi, Isabela Streicher, Larissa Marques, Camila Rocha, Fernanda Cajal, Débora Ferraz, Daiane da Silva, Rosa Caroline de Souza, Mariana Pagnani entre muitos outros, por tudo que vocês representam. Vocês trouxeram felicidades na minha vida. Tenho muitas saudades!

Finalmente, dedico este trabalho a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na concretização desse sonho, dando-me confiança de prosseguir independentemente de qualquer contratempo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS
LISTA DE SÍMBOLOS
LISTA DE SIGLAS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE QUADROS
RESUMO
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO.....01
2. OBJETIVOS.....06
2.1. Objetivos Gerais.....07
2.2. Objetivos Específicos.....07
3. REVISÃO DA LITERATURA.....09
3.1. Sistemas de fornecimento de ATP durante o exercício.....10
3.2. Treinamento físico.....12
3.2.1. Periodização de treinamento.....13
3.2.2. Treinamento intensivo *(Overload training)*.....14
3.3. A síndrome da sobrecarga de treinamento *(Overtraining syndrome)*...16
3.4. Estratégias de otimização da recuperação entre sessões de treinamento.....19
3.5. Técnicas são invasivas para a monitoração do treinamento.....21
3.6. Biomarcadores de lesão tecidual….....23
3.7. Aspectos ergogênicos dos carboidratos no exercício….....25
3.7.1. Ingestão recomendada de carboidratos antes, durante e após o exercício….....25
3.7.2. Efeitos da suplementação com carboidratos no treinamento intensivo *(Overload training)*……...28
3.8. Resposta hormonal no exercício: impacto na homeostase da glicose e nos estoques de glicogênio….....29
3.8.1. Hormônios glicorreguladores no exercício….....31

3.9. Captação de glicose pelo músculo esquelético….....33
3.10. Estoques de lipídios intramusculares – utilização, métodos de análise, dieta e treinamento….....37
4. METODOLOGIA.....40
4.1. Voluntários.....41
4.2. Desenho geral.....41
4.3. Testes preliminares de desempenho e de aptidão cardiorespiratório 42
4.5. Dieta.....43
4.5. Desenho experimental.....44
4.6. Coletas e análise das amostras sanguíneas.....48
4.7.Espectroscopia de prótons por ressonância magnética para determinação da concentração de triacilglicerol intramiocelular……....50
4.8. Análise estatística.....51
5. RESULTADOS.....53
5.1. População de estudo….....54
5.2. Dieta e programa de treinamento.....55
5.2.1. Dieta habitual….....55
5.2.2. Registro alimentar durante o treinamento intenso….....56
5.3. Sessão de corrida intermitente e teste de 1.000 m….....57
5.4. Frequência cardíaca e percepção subjetiva de esforço físico….....58
5.5. Metabólitos e hormônios….....61
5.5.1. Valores basais.....61
5.5.2. Protocolo de testes (9º dia)….....63
5.6. Valores de lipídios intramiocelulares e extramiocelulares mensurados ressonância magnética….....74
5.7. Marcadores de lesão tecidual e contagem de leucócitos….....76
5.7.1. Valores basais….....76
5.7.2. Protocolo de corrida intermitente (9º dia)….....77
5.7.3. Resposta cortisolêmica e sua correlação com marcadores de dano tecidual…….....81
5.8. Percepção do estado de humor….....83
6. DISCUSSÃO.....85
7. CONCLUSÕES.....95

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....97

APÊNDICES

1. Questionário para avaliação do estado de humor dos atletas
2. Ingestão energética e de carboidratos em atletas
3. Características sociodemográficas dos atletas

ANEXO

1. Artigo

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr. doutor

Dra. doutora

et al. e outros

Prof. professor

Profa. professora

vs. versus

LISTA DE SÍMBOLOS

〈. menor

-. menos

µM. micrômetro

µU/mL. microunidades por mililitro

µg/mL. microgramas por mililitro

g/kg. gramas por quilo de peso

h. hora

kcal. calorias

kg. quilo

kg/min. quilo por minuto

km. quilômetros

m. metros

mg. miligramas

mg/dL. miligramas por decilitro

mg/mL. miligramas por mililitro

min. minutos

ml/kg. miligramas por quilo

mm. milimetros

mmol/L. milimol por litro

ng/mL. nanograma por mililitro

pmol/L. picomoles por litro

ppm. parte por milhão

s. segundos

t. tempo

Vm_{3km}. velocidade média dos 3 km

V_{max}. velocidade máxima

V_{med}. velocidade média

VO_{2max}. volume máximo de oxigênio inspirado

LISTA DE SIGLAS

ACSM. *American College of Sports Medicine*

ADA. *American Dietetic Association*

AGL. ácidos graxos livres

ALT. alanina aminotransferase

AMP. adenosina monofosfato

AMPK. 5-AMP-proteína quinase ativada

AST. aspartato aminotransferase

ATP. adenosina trifosfato

ATP-CP. adenosina trifosfato-creatina fosfato

bpm. batimentos por minuto

Ca. cálcio

CaM. calmodulina

CaMK. cálcio-proteína quinase dependente de CaM

Cappesq. Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CHO. carboidratos

CHO/h. carboidrato por hora

CK. creatina quinase

CON. controle

LDH. Lactato desidrogenase

CV. coeficiente de variação

DEXA. densitometria

DNA. ácido desoxirribonucléico

EPM. erro padrão da média

FAT/CD36. proteína transportadora de gordura no músculo CD36

FC. Frequencia cardíaca

FSH. hormônio folículo estimulante

G6P. glicose-6-fosfato

gCYC. genômico Cyclophilin

GH. hormônio do crescimento

GLUT-4. proteína de transporte de glicose no músculo- 4

HCFMUSP. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

IGF-1. fator de crescimento insulina – símile 1

IGFBP-3. proteína 3 ligadora de IGF-1

IGF-1/IGFBP-3. Relação IGF-1/ IGFBP-3

InCor HCFMUSP. Instituto do Coração da FMUSP

LDH. lipídio intramiocelular

LE. lipídio extramiocelular

LH. hormônio luteinizante

LI. lipídio intramiocelular

LMI. Laboratório de Investigação Médica.

NOS. óxido nítrico sintase

PKB. proteína quinase B

PKC. proteína quinase C

POMS. *Profile of Mood State*

RA. registro alimentar

Rec. recuperação

RM. ressonância magnética

RQT. recuperação da qualidade total

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Dispêndio energético em relação à intensidade do exercício. Contribuição da glicose plasmática, do glicogênio muscular, dos ácidos graxos livres e do triacilglicerol (muscular e plasmático) em relação ao total de energia dispendida…….....12

Figura 2. Translocação do GLUT4 e captação de glicose no músculo esquelético durante o exercício.....36

Figura 3. Esquema ilustrativo do desenho experimental referente ao 9º dia de treinamento intenso….....47

Figura 4. Concentração plasmática de glicose e sérica de insulina (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....62

Figura 5. Concentração plasmática de epinefrina (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....64

Figura 6. Concentração sérica do hormônio do crescimento (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....65

Figura 7. Concentração plasmática de lactato (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....66

Figura 8. Concentração sérica de ácidos graxos livres (AGL) (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....67

Figura 9. Concentração sérica de cortisol (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....68

Figura 10. Concentração sérica de testosterona total (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....69

Figura 11. Concentração sérica de testosterona livre (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....70

Figura 12. Concentração sérica de LH (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….…….....70

Figura 13. Concentração sérica de FSH (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....71

Figura 14. Relação testosterona/ cortisol (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....72

Figura 15. Concentração sérica (Média±EPM) de IGF-1 em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....73

Figura 16. Concentração sérica de IGFBP-3 (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo 73

Figura 17. Relação IGF-1/ IGFBP-3 (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....74

Figura 18. Diferença na concentração de lipídio intramiocelular (LI) antes e após treinamento intensivo em corredores competitivos suplementados com carboidratos (Média±EPM)…….....75

Figura 19. Concentração plasmática de DNA livre (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo……79

Figura 20. Concentração sérica (Média±EPM) de lactato desidrogenase em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….....80

Figura 21. Concentração sérica de creatina quinase (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo.....81

Figura 22. Correlações entre as variáveis concentrações de DNA livre e de lactato desidrogenase e contagem de leucócitos *vs.* concentração de cortisol em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo 82

Figura 23. *Scores* do estado de humor (Média±EPM) dos corredores suplementados com carboidratos antes e após treinamento intensivo……..83

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Dados de avaliação física e de treinamento (Média ± EPM) dos 24 corredores competitivos participantes do estudo.....54

Tabela 2. Ingestão energética e de macronutrientes (Média±EPM) dos corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…....56

Tabela 3. Tempo médio (±EPM) da sessão de corrida intermitente (10x800m) e testes de 1.000m em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo….....58

Tabela 4. Frequência cardíaca (Média±EPM) durante as 10 séries de 800m e corrida máxima de 1.000m em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo.....59

Tabela 5. Percepção subjetiva do esforço físico (Média±EPM) durante as 10 séries de 800m e corrida máxima de 1.000m em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo….....60

Tabela 6. Diferença na concentração de lipídio intramiocelular (LI) antes e após treinamento intensivo em corredores competitivos suplementados com carboidratos (Média±EPM)….....76

Tabela 7. Contagem de leucócitos e subpopulações de células brancas (1.000 células/µL ou mm^3) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo (Média±EPM)……...78

Tabela 8. Concentrações séricas das aminotransferases AST e ALT (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo…….80

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Principais sinais e sintomas do *overtraining*.....18

Quadro 2. Escalas de percepção subjetiva ao esforço e de recuperação da qualidade total do treino. Fonte: Borg (2000)[1] e Kenttä e Kasmén (1998)[2] 22

RESUMO

de Sousa MV. *Suplementação com carboidratos durante treinamento intensivo aumenta as concentrações de lipídios intramiocelulares e reduz os marcadores de lesão tecidual em corredores competitivos: interação hormonal e metabólica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 113p.

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos de um microciclo de treinamento intensivo (8 dias), associado ou não à suplementação com carboidratos (CHO), sobre parâmetros metabólicos, hormonais, marcadores de lesão tecidual e estoques de lipídios intramiocelulares em corredores de longa distância. Os efeitos cumulativos desse período de treinamento intensivo e da suplementação com CHO também foram analisados sobre uma sessão de exercício intermitente de alta intensidade e *performance* atlética (9º dia). Participaram do estudo 24 corredores de longa distância do sexo masculino com 28,0±1,3 anos de idade. Os corredores foram distribuídos em dois grupos (grupo CHO ou grupo controle - CON). No grupo CHO, após treinamento intensivo, foram aumentadas as concentrações dos lipídios intramiocelulares (+0,0061±0,0022 e +0,0008±0,0043 *vs.* CON: -0,0091±0,0053 e -0,0224±0,0151; dos músculos tibial anterior e sóleo, respectivamente), da testosterona total (694,0±54,6 ng/dL *vs.* CON: 610,8±47,9 ng/dL) e de sua fração livre (552,7±49,2 pmol/L *vs.* CON: 395,7±36,6 pmol/L). No 9º dia o protocolo consistiu em uma sessão de 10 séries de 800m (100%Vm_{3km}), com pausa de 1min 30s entre as séries. Antes e após a sessão os atletas realizaram teste máximo de 1.000m. A queda no desempenho do 2º teste de 1.000m foi menor no grupo CHO (5,3±1,0%) *vs.* 10,7±1,3% no CON. As concentrações de glicose, lactato, epinefrina, cortisol e GH aumentaram após as 10x800m em ambos os grupos. No entanto, essa resposta foi atenuada no grupo CHO para cortisol (22,4±0,9 pmol/L *vs.* CON: 27,6±1,4 pmol/L) e GH (21,8±5,6 ng/mL *vs.* CON: 36,7±5,0 ng/mL). Ainda após as 10x800m, as concentrações de LDH e DNA livre foram menores no grupo CHO (509,2±23,1 U/L e 48.240,3±5.431,8 alelos/mL) quando comparadas às do grupo CON (643,3±32,9 U/L e 73.751,8±11.546,6 alelos/ mL, respectivamente). Durante o período de recuperação, a diminuição do cortisol, associada às maiores glicemias e insulinemias no grupo CHO, pode ter resultado em efeito anabólico e atenuação da resposta inflamatória. Conclui-se que a suplementação com CHO atenuou a supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal, além de promover melhora do desempenho atlético, aumento dos estoques de lipídios intramiocelulares e menores respostas catabólicas e dos marcadores de dano tecidual.

Descritores: carboidratos, hormônio, testosterona, insulina, L-lactato desidrogenase, desempenho atlético, DNA, espectroscopia de ressonância magnética, exercício

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O método considerado mais adequado de treinamento físico deve englobar o balanço entre alcançar o pico de *performance* e evitar as consequências negativas da síndrome da sobrecarga de treinamento *(overtraining syndrome)* (Angeli *et al.,* 2004). Diante disso, o treinamento intensivo pode ser uma fórmula para o sucesso ou a falência de uma carreira profissional (Halson e Jeukendrup, 2004).

Segundo McKenzie (1999), essa síndrome acomete cerca de 65% dos corredores de longa distância em algum momento da sua carreira profissional.

A maior atividade do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em repouso, além da supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e imunossupressão, são eventos comumente associados à síndrome da sobrecarga de treinamento (Kraemer *et al.,* 2008; Gleeson, 2007; Simões *et al.,* 2004).

Os exercícios intensos utilizam os carboidratos (CHO) como fonte primária de energia (ACSM, 2009). Como esses estoques no organismo humano são limitados, representando apenas 1-2% do total da energia estocada no corpo, o requerimento de CHO na dieta de atletas deve ser maior.

Por isso, dias consecutivos de treinamento intenso, associados à ingestão insuficiente de CHO, podem prejudicar a recuperação das microlesões pós-treino, em consequência do estado catabólico acentuado

(Gleeson, 2007; Sousa e Tirapegui, 2005), além de resultarem em diminuição dos estoques energéticos e do processo de ressíntese do glicogênio muscular (Wallis *et al.,* 2008; de Sousa *et al.,* 2007).

Tanto a dieta como o treinamento físico são fatores que também podem afetar as reservas intramusculares de triacilglicerol (Kiens, 2006), importante substrato energético utilizado nos exercícios de longa duração. Porém, ainda não se sabe os efeitos dos triacilglicerol intramuscular na *performance* atlética (Johnson *et al.* 2004). Segundo van Loon (2004), dietas ricas em gorduras (40 a 65% da ingestão energética diária) têm demonstrado forte correlação com o conteúdo de lipídios intramiocelulares (LI), aumentando-o em 50-100% após a ingestão dessas dietas. Entretanto, dietas ricas em CHO, com ingestão de lipídios entre 2 a 25% do valor energético diário, têm resultado em redução de 10-30% dos estoques de LI. Por outro lado, até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito de dietas com concentrações de CHO entre 7 e 10 g/Kg de peso corporal durante treinamento intensivo sobre os estoques de LI em corredores competitivos.

Durante o período de treinamento, o atleta pode ser acometido de infecções, ter diminuição na *performance* atlética, além da sensação de insatisfação profissional (Wade *et al.,* 2005; Tremblay *et al.,* 2004; Halson e Jeukendrup, 2004). Assim, torna-se relevante o planejamento de estratégias nutricionais associadas à monitorização de parâmetros hormonais, imunológicos, de lesão tecidual e de composição corporal durante o treinamento, em especial na fase de sobrecarga (*overload).*

No estudo de Fatouros *et al.* (2006), a concentração de DNA livre plasmático aumentou em proporção à carga de treinamento, classificando-a como um sensível marcador para a síndrome da sobrecarga de treinamento.

Independente do tipo de exercício, a ingestão calórica e a concentração de nutrientes da dieta podem influenciar a respostao hormonal no organismo, auxiliando no controle dos mecanismos fisiológicos relacionados à recuperação pós-exercício intenso. No que diz respeito à depleção e à ressíntese de glicogênio, perda ou ganho de massa muscular e controle da gordura corporal, a resposta dos hormônios testosterona, crescimento (GH), fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) e cortisol tem sido utilizada em alguns estudos para monitorização do estado catabólico (Judelson, 2008; Kraemer *et al.,* 1998).

No que tange ao período de treinamento intenso, Achten *et al.* (2004) constataram melhora na *performance* física e no estado de humor em corredores que receberam dieta rica em CHO quando comparada à dieta restrita em CHO durante treinamento intensificado, sendo observado, neste último, redução de 8,2±2,1% na *performance* de 16 km.

No entanto, em estudo prévio no qual avaliamos corredores submetidos a sessões de exercícios de alta intensidade na vigência de ingestão aguda de CHO (~54 g) ou placebo (PLA), constatamos que a suplementação de CHO não alterou o desempenho atlético e a percepção subjetiva ao esforço físico. Observamos aumento da glicemia durante o exercício em ambos os grupos, retornando aos valores pré-exercício durante o período de recuperação, indicando acentuada velocidade de captação da

glicose após esforços intensos. A concentração elevada de lactato no grupo suplementado (CHO) pós-exercício ocorreu possivelmente devido à maior glicólise. A concentração de cortisol aumentou durante o exercício sem diferença significativa entre os grupos (de Sousa *et al.,* 2007).

A maior parte dos estudos com suplementação de CHO em atletas foi realizada em exercícios contínuos e de longa duração, com administração de forma aguda, durante apenas uma sessão de exercício, avaliados em laboratórios de pesquisa por meio de cicloergômetros ou esteira, e com considerável restrição de CHO no grupo CON ficando muito aquém da recomendação nutricional preconizada. Assim consideramos relevante investigar os efeitos ergogênicos a longo prazo da suplementação com CHO durante dias consecutivos de exercícios intermitentes de alta intensidade, característicos do treinamento intensivo (o*verload)* em corredores de alto rendimento, avaliando-os o mais próximo possível das suas condições habituais de treino.

Diante do exposto, avaliamos o impacto de um microciclo de treinamento intensivo com dietas acima de 7g de CHO/kg de peso corporal, com ou sem suplementação de CHO, sobre variáveis metabólicas, hormonais, imunológicas, de lesão tecidual, de composição corporal e de desempenho físico em corredores competitivos. Caso tais condutas resultem em diminuição dos hormônios de estresse, incremento dos estoques energéticos (ex. lipídios intramiocelular) e melhora do desempenho físico, poderemos demonstrar o seu benefício tanto na qualidade do treinamento quanto na prevenção de lesão muscular devido à atenuação do catabolismo.

ABSTRACT

de Sousa MV. *Carbohydrate supplementation during overload training increases intramyocellular lipids stores and reduces markers of tissue damage in competitive runners. Hormonal and metabolic interation* [*thesis*]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 113p.

This study aimed to evaluate the effects of intensive microcycle training (8 days), with and without CHO supplementation, on the metabolic and hormonal responses of long distance runners. Markers for tissue damage and intramyocellular lipid stores were also investigated, along with the cumulative effects of this kind of CHO supplementation on a further session of high intensity intermittent running and athletic performance (day 9). The study included 24 male long distance runners with a mean age of 28.0±1.3 years. The runners were divided into two groups (CHO (supplemented) and CON (control)). In the CHO group, the intramyocellular lipids (+0.0061 ± 0.0022 +0.0008 ± 0.0043 and vs. CON: -0.0091 ± 0.0053 and -0.0224 ± 0.0151; for the tibialis anterior and soleus muscles, respectively), total testosterone (694.0±54.6 ng/dL vs. CON: 610.8±47.9 ng/dL) and its free fraction (552.7±49.2 pmol/L vs. CON: 395.7±36.6 pmol/L) were increased after intensive training. On the 9th day all participants ran 10x800m at 100% Vm3km intensity. An all-out 1000m run was performed before and after the 10x800m session and it was noted that the performance decrease for the second 1000m was lower for the CHO-group (5.3±1.0% vs. CON: 10.6±1.3%). Glucose, lactate, epinephrine, cortisol and GH concentrations increased after 10x800m in both groups, but an attenuated response was noted for the CHO group for cortisol (22.4±0.9 pmol/L vs. CON: 27.6±1.4 pmol/L) and GH (21.8±5.6 ng/mL vs. CON: 36.7±5.0 ng/mL). Moreover, the LDH and free plasma DNA concentrations were lower in the CHO group (509.2±23.1 U/L and 48240.3±5431.8 Allels/mL) compared to the CON group (643.3±32.9 U/L and 73751.8±11546.6 Allels/mL, respectively) after the 10x800m run. During the recovery period, the observed lower cortisol response in the CHO group as well as to the higher glucose and insulin concentrations may have resulted in better anabolic effects and attenuation of inflammation response. This may be linked to. In conclusion CHO supplementation attenuates the suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, and result in better physical performance, higher levels of intramyocellular lipid stores, and lower catabolic responses and levels of markers for tissue damage.

Descriptors: carbohydrate, hormone, testosterone, insulin, lactate dehydrogenase, athletic performance, DNA, magnetic resonance spectroscopy

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O método considerado mais adequado de treinamento físico deve englobar o balanço entre alcançar o pico de *performance* e evitar as consequências negativas da síndrome da sobrecarga de treinamento *(overtraining syndrome)* (Angeli *et al.,* 2004). Diante disso, o treinamento intensivo pode ser uma fórmula para o sucesso ou a falência de uma carreira profissional (Halson e Jeukendrup, 2004).

Segundo McKenzie (1999), essa síndrome acomete cerca de 65% dos corredores de longa distância em algum momento da sua carreira profissional.

A maior atividade do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em repouso, além da supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e imunossupressão, são eventos comumente associados à síndrome da sobrecarga de treinamento (Kraemer *et al.,* 2008; Gleeson, 2007; Simões *et al.,* 2004).

Os exercícios intensos utilizam os carboidratos (CHO) como fonte primária de energia (ACSM, 2009). Como esses estoques no organismo humano são limitados, representando apenas 1-2% do total da energia estocada no corpo, o requerimento de CHO na dieta de atletas deve ser maior.

Por isso, dias consecutivos de treinamento intenso, associados à ingestão insuficiente de CHO, podem prejudicar a recuperação das microlesões pós-treino, em consequência do estado catabólico acentuado

(Gleeson, 2007; Sousa e Tirapegui, 2005), além de resultarem em diminuição dos estoques energéticos e do processo de ressíntese do glicogênio muscular (Wallis *et al.,* 2008; de Sousa *et al.,* 2007).

Tanto a dieta como o treinamento físico são fatores que também podem afetar as reservas intramusculares de triacilglicerol (Kiens, 2006), importante substrato energético utilizado nos exercícios de longa duração. Porém, ainda não se sabe os efeitos dos triacilglicerol intramuscular na *performance* atlética (Johnson *et al.* 2004). Segundo van Loon (2004), dietas ricas em gorduras (40 a 65% da ingestão energética diária) têm demonstrado forte correlação com o conteúdo de lipídios intramiocelulares (LI), aumentando-o em 50-100% após a ingestão dessas dietas. Entretanto, dietas ricas em CHO, com ingestão de lipídios entre 2 a 25% do valor energético diário, têm resultado em redução de 10-30% dos estoques de LI. Por outro lado, até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito de dietas com concentrações de CHO entre 7 e 10 g/Kg de peso corporal durante treinamento intensivo sobre os estoques de LI em corredores competitivos.

Durante o período de treinamento, o atleta pode ser acometido de infecções, ter diminuição na *performance* atlética, além da sensação de insatisfação profissional (Wade *et al.,* 2005; Tremblay *et al.,* 2004; Halson e Jeukendrup, 2004). Assim, torna-se relevante o planejamento de estratégias nutricionais associadas à monitorização de parâmetros hormonais, imunológicos, de lesão tecidual e de composição corporal durante o treinamento, em especial na fase de sobrecarga (*overload).*

No estudo de Fatouros *et al.* (2006), a concentração de DNA livre plasmático aumentou em proporção à carga de treinamento, classificando-a como um sensível marcador para a síndrome da sobrecarga de treinamento.

Independente do tipo de exercício, a ingestão calórica e a concentração de nutrientes da dieta podem influenciar a respostao hormonal no organismo, auxiliando no controle dos mecanismos fisiológicos relacionados à recuperação pós-exercício intenso. No que diz respeito à depleção e à ressíntese de glicogênio, perda ou ganho de massa muscular e controle da gordura corporal, a resposta dos hormônios testosterona, crescimento (GH), fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) e cortisol tem sido utilizada em alguns estudos para monitorização do estado catabólico (Judelson, 2008; Kraemer *et al.,* 1998).

No que tange ao período de treinamento intenso, Achten *et al.* (2004) constataram melhora na *performance* física e no estado de humor em corredores que receberam dieta rica em CHO quando comparada à dieta restrita em CHO durante treinamento intensificado, sendo observado, neste último, redução de 8,2±2,1% na *performance* de 16 km.

No entanto, em estudo prévio no qual avaliamos corredores submetidos a sessões de exercícios de alta intensidade na vigência de ingestão aguda de CHO (~54 g) ou placebo (PLA), constatamos que a suplementação de CHO não alterou o desempenho atlético e a percepção subjetiva ao esforço físico. Observamos aumento da glicemia durante o exercício em ambos os grupos, retornando aos valores pré-exercício durante o período de recuperação, indicando acentuada velocidade de captação da

glicose após esforços intensos. A concentração elevada de lactato no grupo suplementado (CHO) pós-exercício ocorreu possivelmente devido à maior glicólise. A concentração de cortisol aumentou durante o exercício sem diferença significativa entre os grupos (de Sousa *et al.,* 2007).

A maior parte dos estudos com suplementação de CHO em atletas foi realizada em exercícios contínuos e de longa duração, com administração de forma aguda, durante apenas uma sessão de exercício, avaliados em laboratórios de pesquisa por meio de cicloergômetros ou esteira, e com considerável restrição de CHO no grupo CON ficando muito aquém da recomendação nutricional preconizada. Assim consideramos relevante investigar os efeitos ergogênicos a longo prazo da suplementação com CHO durante dias consecutivos de exercícios intermitentes de alta intensidade, característicos do treinamento intensivo (o*verload)* em corredores de alto rendimento, avaliando-os o mais próximo possível das suas condições habituais de treino.

Diante do exposto, avaliamos o impacto de um microciclo de treinamento intensivo com dietas acima de 7g de CHO/kg de peso corporal, com ou sem suplementação de CHO, sobre variáveis metabólicas, hormonais, imunológicas, de lesão tecidual, de composição corporal e de desempenho físico em corredores competitivos. Caso tais condutas resultem em diminuição dos hormônios de estresse, incremento dos estoques energéticos (ex. lipídios intramiocelular) e melhora do desempenho físico, poderemos demonstrar o seu benefício tanto na qualidade do treinamento quanto na prevenção de lesão muscular devido à atenuação do catabolismo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos cumulativos de um microciclo de treinamento intensivo (8 dias), associado ou não à suplementação com carboidratos (CHO), sobre parâmetros metabólicos, hormonais, marcadores de lesão tecidual e concentração de lipídios intramiocelulares em corredores de longa distância; e investigar os efeitos desse período de treinamento intensivo com suplementação de CHO em uma sessão de corrida intermitente de alta intensidade e desempenho atlético (9º dia).

2.2 Objetivos específicos

Investigar o efeito da suplementação com CHO e do exercício intenso em parâmetros:

a) bioquímicos: glicose, lactato e ácidos graxos livres;
b) hormonais: insulina, hormônio do crescimento (GH), hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona total, testosterona livre, cortisol, epinefrina, fator de crescimento insulina – símile 1 (IGF-1) e proteína 3 ligadora de IGF-1 (IGFBP-3);

c) desempenho atlético: corridas de 1.000m em pista de atletismo e percepção subjetiva ao esforço físico;
d) estoques de triacilglicerol intramuscular: espectroscopia de ressonância magnética (RM);
e) marcadores de lesão tecidual: DNA livre plasmático, creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase);
f) imunológica: contagem de leucócitos;
g) percepção do estado de humor: questionário de sintomas

3. REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sistemas de fornecimento de ATP durante o exercício

São quatro os sistemas de ressíntese de ATP durante o exercício, compreendendo os sistemas anaeróbio alático, glicólise anaeróbia e sistemas aeróbio glicolítico e lipolítico (Williams, 2002).

O sistema anaeróbio alático ou ATP-CP consiste na hidrólise do ATP no início do exercício, principalmente o de maior intensidade. A reserva de ATP intramuscular é extremamente pequena e se esgota após alguns segundos de exercício e, para que haja ressíntese deste ATP, ocorre hidrólise das moléculas de fostato de creatina que transferem fosfato para este fim (Tirapegui, 2005). Essa via tem participação especialmente nos esportes de curtíssima duração e alta intensidade, como as corridas de 100m rasos e saltos. Porém, após alguns segundos, este substrato é depletado, sendo compensado pela participação gradual das demais vias metabólicas (Williams, 2002).

Na via anaeróbia glicolítica, moléculas de glicose ou glicogênio são utilizados como substratos no citosol da célula. Antes da glicose ou do glicogênio serem utilizados na ressíntese de ATP, eles devem ser convertidos num composto denominado glicose-6-fosfato (Stryer, 1996). A glicólise produz ácido pirúvico e este, é convertido em ácido láctico. Essa via metabólica tem sua participação efetiva na ressíntese de ATP em esforços

intensos com duração de 20 segundos (s) a 3 minutos (min), como as corridas de 400 e 800m. O saldo dessa via é de 3 moles de ATP para cada mol de glicogênio degradado e de apenas 2 moles de ATP, a partir da glicose (Williams, 2002; Hawley e Hopkins, 1995).

Na via aeróbia, a ressíntese de ATP ocorre no interior das mitocôndrias. Nos músculos elas se localizam adjacentes às miofibrilas e também se encontram difundidas no sarcoplasma. Esse processo impõe considerável demanda sobre a capacidade do organismo de liberar oxigênio aos músculos ativos (Wilmore e Costill, 2001).

Sendo assim, no músculo, 1 mol de glicose é capaz de sintetizar 36 moles de ATP (Riegel, 2005). Esse rendimento energético pode ser muito maior, caso uma molécula de ácido graxo seja oxidada (Wilmore e Costill, 2001).

Tanto em atividades de curta duração e de alta intensidade como naquelas mais prolongadas e de intensidade moderada, o glicogênio exerce papel fundamental na manutenção do desempenho (Tirapegui, 2005). A degradação do glicogênio ocorre de maneira mais pronunciada numa primeira fase da atividade, apresentando relação exponencial com a intensidade do exercício (Hawley e Hopkins, 1995). Durante exercícios prolongados, realizados em intensidades a partir de 60% do volume máximo de oxigênio inspirado (VO_{2max}), o substrato mobilizado predominante é o glicogênio muscular (van Loon, 2004). Essa via metabólica é mais utilizada em atividades de longa distância, como corridas, ciclismo e triathlon.

Segundo Wolfe (1998), nos exercícios prolongados, a glicogenólise muscular ocorre preferencialmente nas fibras do tipo I, e também nas do tipo II, nos momentos finais da prova. Conforme demonstrado por van Loon (2004), nas atividades de intensidades baixa a moderada (30-70% VO_{2max}), aumenta-se a utilização de outros substratos energéticos, como as gorduras (figura 1).

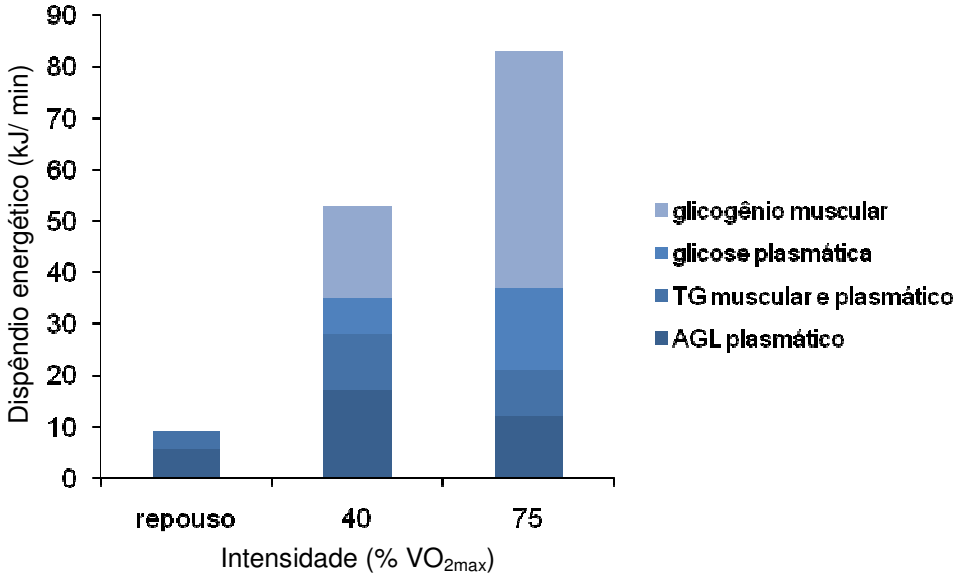


Figura 1. Dispêndio energético em relação à intensidade do exercício. Contribuição da glicose plasmática, do glicogênio muscular, dos ácidos graxos livres (AGL) e do triacilglicerol (TG) muscular e plasmático em relação ao total de energia dispendida. Fonte: Adaptado de van Loon (2004)

3.2 Treinamento físico

O treinamento físico consiste em um programa de exercícios realizados cronicamente, desencadeando adaptações morfo-funcionais que contribuem para melhora do desempenho motor (McArdle, 1998).

A sobrecarga imposta em um programa de treinamento é deferida pelo volume e intensidade empregados nas sessões de treinamento. Na medida em que o praticante se adapta ao regime de exercício que fora prescrito, é necessário implementar a sobrecarga, tornando o treinamento mais intenso ou com maior volume, esperando que com isso novas adaptações ocorram. Este procedimento recebe o nome de princípio da sobrecarga de treinamento e é reconhecido como um dos princípios mais importantes do treinamento (Elliot, 1998).

Indivíduos altamente treinados, como atletas de elite, teoricamente já exploraram quase todo seu potencial de desempenho, de modo que estratégias têm sido utilizadas para otimizar ganhos adicionais na forma física. Uma destas estratégias é submeter o praticante a um período de *overload*, ou seja, alguns dias, ou semanas de regime de treinamento intenso, seguidos de redução subsequente, esperando que ocorra supercompensação e melhora adicional no desempenho (Bompa, 1999).

3.2.1 Periodização do treinamento

A periodização do treinamento desportivo pode ser entendida como uma divisão organizada do treinamento dos atletas buscando prepará-los para alcançar objetivos previamente estabelecidos, como por exemplo o melhor desempenho físico em um determinado evento esportivo (Elliot, 1998).

Para tanto, se fazem necessários os ajustes das cargas de trabalho nos três grandes períodos de treinamento, a saber: períodos preparatório, competitivo e transitório (Bompa, 1999).

- O período preparatório é relativo à aquisição da forma esportiva;
- O período competitivo é relativo à manutenção da forma esportiva, e;
- O período transitório é responsável pela perda temporal da forma esportiva.

3.2.2 Treinamento intensivo *(Overload training)*

O esporte moderno, particularmente o de elite, é extremamente competitivo. Com isso, os métodos de treinamento têm mudado drasticamente, sendo considerado adequado aquele que engloba o balanço entre alcançar o pico de *performance* e evitar as consequências negativas do *overtraining* (Angeli *et al.,* 2004).

Segundo Halson e Jeukendrup (2004), o treinamento com volume moderado, mesmo considerado aceitável, pode não resultar na adaptação desejada (ex. possível ganho de *performance*). Enquanto aquele considerado acima do confortável pode resultar numa condição usualmente conhecida como a síndrome do *overtraining*. Dessa maneira, o treinamento

intensivo pode ser uma fórmula para o sucesso ou a falência de uma carreira profissional (McKenzie, 1999).

É fato conhecido que atletas treinam arduamente, visando melhora da *performance*. O aumento do volume de treinamento é um exemplo de sobrecarga no sistema endócrino, em especial no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, interferindo na homeostase do organismo (Simões *et al.,* 2004). Algumas evidências, entretanto, reportam que programas de treinamento intenso e torneios competitivos são duas condições específicas que podem contribuir para melhora ou decréscimo da *performance* atlética adquirida (Kenttä e Hassmén, 1998).

O período de treinamento que engloba aplicação de sobrecarga progressiva, acima de um patamar considerado confortável, é denominado de princípio de *overload* e tem como objetivo a maximização da *performance* atlética (Achten *et al.,* 2004).

Segundo Simões *et al.* (2004) e Tirapegui (2005), nessa fase de *overload*, para que ocorra adaptação no organismo, é necessário que o treinamento e/ou atividade praticados sejam feitos em intensidade acima do normal, naquela que o praticante já se adaptou, para que haja quebra da homeostase interna do organismo e este, responda ao estímulo, adaptando-se e evoluindo funcionalmente.

Como já mencionado, essa resposta adaptativa pode ser positiva, negativa ou ausente, dependendo da intensidade e do volume desse estímulo. Segundo Halson e Jekendrup (2004), essa pode ser negativa se o estímulo for muito além do que o sujeito está acostumado, ou além de suas

reservas funcionais, ou, ainda, se o período de recuperação entre os estímulos for pequeno, não permitindo a reposição orgânica mínima necessária. Tem-se, também, o risco do estímulo aplicado ficar aquém ou no mesmo nível do habitual para o atleta (Kenttä e Hassmén, 1998). Para que ocorra a adaptação positiva desejável é necessário que se acerte na intensidade aplicada, mesmo que acima do normal. Para tanto, a aplicação de testes fisiológicos e de desempenho e, ainda, o período de recuperação entre os estímulos, devem ser respeitados (Urhausen *et al.,* 1995; Grant, 1997).

3.3 A síndrome da sobrecarga de treinamento *(Overtraining syndrome)*

Do ponto de vista clínico, duas condições têm sido associadas à repentina queda do rendimento físico de atletas sob regime de treinamento intenso. Essas condições são referidas como *overtraining* e *overreaching* (Halson e Jeukendrup, 2004).

A síndrome da sobrecarga de treinamento afeta 65% dos corredores de longa distância em algum momento da sua carreira profissional e é caracterizada pela associação entre um programa exaustivo de treinamento com insuficiente período de recuperação e concomitante prejuízo da *performance* (McKenzie, 1999). Além do prejuízo na *performance,* outros sinais ou sintomas associados com o *overtraining* incluem fadiga generalizada, depressão, perda de apetite, infecções do trato respiratório

superior, dores musculares e articulares, entre outros (Smith, 2000). A síndrome do *overtraining* é precedida de uma fase inicial denominada de *overreaching* (Rogero e Tirapegui, 2003).

O *overreaching* ocorre como resultado de um treinamento intensificado que comumente afeta atletas de elite devido ao insuficiente período de recuperação (aproximadamente 2 semanas). Já para a síndrome de *overtraining*, o tempo de recuperação deve ser ainda maior, podendo durar meses ou anos (Halson e Jeukendrup, 2004).

A hiperatividade do sistema nervoso autônomo simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, além da supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas estão associadas à síndrome de *overtraining,* embora não esteja definido se como causa ou consequência (Wilmore e Costill, 2000; Simões *et al.,* 2004).

No estudo de revisão de literatura de Angeli *et al.* (2004), os sinais e os sintomas da síndrome de *overtraining* estão categorizados em 4 classes: alteração das funções fisiológicas e adaptação da *performance*, prejuízos psicológicos, disfunção imunológica e anormalidades bioquímicas (quadro 1).

Alterações das funções fisiológicas e adaptativas à *performance*	
• Redução da *performance físca* • Dores e sensibilidade nos músculos • Fadiga crônica • Insônia • Distúrbios gastrointestinais	• Diminuição da força muscular • Recuperação prolongada • Dor de cabeça • Alterações da função sexual, da pressão sanguínea e da frequência cardíaca
Sintomas psicológicos	
• Sensação de depressão • Apatia • Dificuldade de concentração • Instabilidade emocional • Receio de competir	• Perda de apetite • Exaltação • Descontentamento • Desinteresse • Inibição
Disfunções imunológicas	
• Aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas • Reativação de infecções por herpes • Diminuição da atividade funcional de neutrófilos	• Diminuição da contagem de leucócitos • Diminuição da produção e secreção de imunoglobulinas
Alterações bioquímicas	
• Diminuição da concentração de hemoglobina, ferro sérico e ferritina • Balanço nitrogenado negativo • Aumento da concentração de uréia e de ácido úrico • Diminuição da concentração de glutamina	• Depleção dos minerais (Zn, Co, Al, Mn, Se, Cu, etc) • Redução da testosterona livre • Redução da relação testosterona/cortisol em mais de 30%

Quadro 1. Principais sinais e sintomas do *overtraining*
Fonte: Angeli *et al.* (2004)

3.4 Estratégias de otimização da recuperação entre sessões de treinamento

O principal fator responsável para o desencadeamento da síndrome de *overtraining* é o insuficiente período de recuperação do treinamento intenso e prolongado (Urhausen *et al*., 1995; Mckenzie, 1999; Angeli *et al.,* 2004).

Segundo Kenttä e Hassmén (1998), dentre as estratégias direcionadas à recuperação, 4 categorias têm sido apontadas: nutrição e hidratação, descanso adequado, relaxamento e suporte emocional e, por último, descanso ativo e, possivelmente, alongamento.

Quanto à nutrição e à hidratação, grande parcela dos atletas falham. A ingestão de carboidratos e energia é, na maioria das vezes, insuficiente para atender a demanda do treinamento intenso e estas têm sido associadas ao desenvolvimento de sinais relacionados ao cansaço (Kenttä e Hassmén, 1998). Uma dieta insuficiente em calorias e a inadequada ingestão hídrica diminuem a capacidade de tolerar o estresse fisiológico do treinamento (de Sousa *et al.,* 2007). Sabe-se, ainda, que a reposição do glicogênio e dos fluídos corporais é necessária para se tolerar a frequente carga de treinamento intenso (Sousa e Tirapegui, 2005). Com base nessas evidências, especula-se que um estado de depleção de glicogênio muscular pode ser uma das causas ou ao menos um contribuidor para os sintomas de *overreaching* em atletas.

Dietas deficientes em carboidratos (CHO) prejudicam a capacidade de recuperação das microlesões pós-treino, consequente ao estado catabólico acentuado que, por sua vez, interfere no desempenho físico durante os treinamentos (Achten *et al.* 2004). A reposição inadequada de carboidratos durante o exercício pode comprometer o sistema imunológico, ficando o atleta mais predisposto às infecções (Gleeson e Bishop, 2000; Andrews *et al.,* 2003). Além disso, a ingestão de fluídos tem função que vai além da manutenção da *performance,* pois cada grama de carboidrato retem 3g de água para formar o glicogênio muscular. Assim, a quantidade insuficiente de água prejudica a *performance,* por assegurar menor estoque de glicogênio (Kenttä e Hassmén, 1998).

Kenttä e Hassmén (1998) conceituam o descanso como a interrupção de atividade física durante o dia (descanso passivo), com horas suficientes de sono. Quando se objetiva a melhora da recuperação, o descanso é o fator mencionado com mais frequência (Urhausen *et al.,* 1995; Mckenzie, 1999; Angeli *et al.,* 2004; Halson e Jeukendrup, 2004).

No que diz respeito às estratégias de relaxamento, algumas técnicas, como flutuação na água, massagens e saunas, têm sido sugeridas como intervenção pró-ativa de recuperação (Kenttä e Hassmén, 1998). Períodos sem treinar também são indicados a fim de prevenir que atletas fiquem totalmente preocupados com seu esporte. A redução de todos os fatores de estresse fora dos treinos, tais como ocupacionais, educacionais, financeiros e sociais, e a incorporação de descanso adequado, terapia de relaxamento, aconselhamento, fisioterapia, sauna e massagens na rotina do atleta são

estratégias usadas por psicólogos do esporte (McKenzie, 1999; Costa e Samulski, 2005).

A última estratégia de recuperação proposta por Kenttä e Hassmén (1998) diz respeito ao repouso ativo, que significa baixos volume e intensidade de treinamento, que pode acelerar o processo de recuperação. Nesse caso, é aconselhado ao atleta participar de diferentes esportes nos quais a *performance* não será mensurada, sendo o exercício utilizado como uma estratégia terapêutica para facilitar o processo de recuperação. O alongamento tem efeito similar à massagem e ao repouso ativo, por aumentar o fluxo sanguíneo pelo músculo (Costa e Samulski, 2005).

3.5 Técnicas não invasivas para monitoração do treinamento

Atletas de elite e seus treinadores precisam de um sistema para monitorar o treinamento e a recuperação (Kenttä e Hassmén, 1998; Mckenzie, 1999; Angeli *et al.,* 2004; Halson e Jeukendrup, 2004).

Técnicas não invasivas podem ser usadas a fim de se monitorar a recuperação psicofisiológica, otimizando o balanço entre treino e descanso, reduzindo o risco de lesões por sobrecarga e de infecções, auxiliando o atleta na manutenção do programa de treinamento (Mckenzie, 1999; Halson e Jeukendrup, 2004). A exemplo disso, temos os questionários de percepção subjetiva ao esforço (PSE) e de recuperação da qualidade total (RQT), que

podem ser visualizados no quadro 2; e o questionário de estado de humor (*Profile of Mood States – POMS*) que segue no apêndice (apêndice 1).

A versão original do questionário *POMS* compreende uma lista com 65 adjetivos com o propósito de mensurar o estado emocional transiente de tensão-ansiedade, depressão-desânimo, fadiga-inércia, vigor-atividade, confusão-atordoamento, raiva-hostilidade. Grove e Prapavessis (1992), criaram uma versão reduzida desse questionário com 40 adjetivos que ficou conhecido por *short POMS,* o qual foi aplicado no presente estudo.

Percepção subjetiva ao esforço (PSE)[1]	**Recuperação da qualidade total (RQT)[2]**
6	6
7 muitíssimo fraco	7 muitíssimo lenta
8	8
9 muito fraco	9 muito lenta
10	10
11 moderadamente fraco	11 lenta
12	12
13 um pouco forte	13 razoável
14	14
15 forte	15 boa
16	16
17 muito forte	17 muito boa
18	18
19 muitíssimo forte	19 muitíssimo boa
20	20

Quadro 2. Escalas de percepção subjetiva ao esforço e de recuperação da qualidade total do treino. Fonte: Borg (2000)[1] e Kenttä e Kasmén (1998)[2]

Welsh *et al*. (2002) avaliaram o efeito da ingestão de fluídos contendo CHO e eletrólitos na função física e mental em praticantes de futebol e basquete. O protocolo experimental foi composto por 4x15 min de exercícios intermitentes com diferentes intensidades do VO_{2max} (caminhada, trote, corrida, *sprint* e saltos) com pausa de 20 min entre as séries e seguido por uma sessão de corrida intermitente de alta intensidade até a exaustão. Os voluntários da triagem CHO obtiveram melhor *performance* física, na última série (4ª série) de exercício intermitente. Quanto à função mental, menores escores do *POMS* foram observados na triagem CHO ao término do protocolo.

3.6 Biomarcadores de lesão tecidual

Além dos danos psicológicos e das alterações fisiológicas com subsequente perda de desempenho físico, a síndrome da sobrecarga de treinamento pode estar associada ao aumento da susceptibilidade a infecções devido a alterações no estado funcional das células imunes e anormalidades bioquímicas (Angeli *et al.,* 2004).

De acordo com Brancaccio *et al.* (2007), Romano-Ely *et al.* (2006) e Fatouros *et al.* (2006), as concentrações de creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e DNA livre plasmático, respectivamente, podem estar associadas à lesão muscular induzida pelo excesso de treinamento.

Fatouros *et al.* (2006) observaram aumento na concentração de DNA livre plasmático em proporção à carga de treinamento durante 12 semanas de exercício crônico, sugerindo, dessa forma, que o DNA plasmático possa ser um sensível marcador para a síndrome do excesso de treinamento.

Nas investigações de Bessa *et al.* (2008), Su *et al.* (2008), Mougios (2007), Totsuka *et al.* (2002) bem como na revisão de literatura de Brancaccio *et al.* (2007), as concentrações de CK e / ou LDH aumentam após o exercício. Segundo esses autores, há inúmeras variáveis que influenciam estas concentrações circulantes tais como duração e intensidade do exercício, condicionamento físico, tempo de treinamento, composição corporal, etnia e dieta.

No estudo de Overgaard *et al.* (2004), as concentrações de LDH aumentaram imediatamente após as sessões de corridas de 10 e 20km, não sendo observada alteração significativa na resposta da CK. Tanto a LDH como a CK estiveram elevadas durante 24h do período de recuperação, sendo esse aumento ainda maior após a sessão de 20km. Outros estudos corroboram esses achados, onde as concentrações de CK aumentaram 24h após o exercício (Close *et al.* 2005, Tsai *et al.* 2001).

3.7 Aspectos ergogênicos dos carboidratos no exercício

3.7.1 Ingestão recomendada de carboidratos antes, durante e após o exercício

Atletas precisam consumir energia adequada durante os períodos de treinamento de alta intensidade ou de treinamento de longa duração para manutenção do peso, da saúde e, por fim, para maximizar os efeitos do treinamento (ACSM, 2009).

A *American Dietetic Association (ADA)* recomenda a ingestão de carboidratos entre 6 e 10g/kg de peso corporal/ dia para atletas, a fim se manter a glicemia durante o exercício e favorecer a recuperação dos estoques de glicogênio muscular. A quantidade ofertada depende do gasto energético diário, tipo de esporte, sexo e condições ambientais (ACSM, 2009).

Entretanto, no trabalho de revisão de de Sousa e Tirapegui (2005), observamos que a maioria dos atletas de diferentes modalidades esportivas ficam muito aquém da recomendação preconizada, fato que pode comprometer a qualidade dos treinos, a saúde e a carreira profissional (apêndice 2).

É recomendado que, antes do exercício, a refeição ou o lanche ofereçam quantidades suficientes de fluídos para a manutenção da hidratação, e tenham baixo teor em lipídios e fibras, para facilitar o esvaziamento gástrico e minimizar desconfortos gastrointestinais. Sua

composição deve ser, ainda, alta em CHO, para promover a manutenção da glicemia e moderada em proteínas, contemplando diferentes grupos alimentares, e que seja bem tolerada pelos atletas (ACSM, 2009).

Segundo Jacobs e Sherman (1999), é consenso que, para a otimização do desempenho físico em atividades carboidrato-dependentes, a suplementação de CHO (exceto frutose), numa concentração acima de 45 g/hora, é indicada durante o exercício.

A *American Dietetic Association (ADA)* recomenda, como meta principal para reposição das perdas hídricas e manutenção da glicemia, a ingestão de 30 a 60g/CHO/h durante o exercício (ACSM, 2009).

Os estoques de glicogênio no músculo esquelético atingem cerca de 500g e representam 82% do CHO endógeno. Aproximadamente 100g estão armazenados no fígado (14% do total de CHO endógeno) e o restante, compreende a glicose presente no plasma (4% do total de CHO endógeno), podendo essas concentrações variarem em consequência do estado de treinamento e do estado nutricional do atleta (Wasserman, 2009; Hargreaves, 1995). Segundo Hargreaves (1995), quanto mais condicionado estiver o atleta, maior a sua capacidade de estocar glicogênio, podendo atingir 900g no músculo esquelético.

Visando a adequada reposição desses estoques, a ingestão de CHO pós-exercício deve estar entre 1 e 1,5g/kg de peso corporal durante 30 min e novamente a cada 2h durante as 4-6h de recuperação do exercício. A *ADA* também recomenda que, nesse período, a dieta ofereça quantidades adequadas de fluídos, eletrólitos e energia (ACSM, 2009).

Após o exercício, a taxa de ressíntese do glicogênio é maior nas duas primeiras horas. Acredita-se que a ressíntese máxima do glicogênio ocorra quando os atletas iniciam o consumo de carboidratos logo após o término do exercício, numa faixa entre 0,7 e 1,5g CHO/kg de peso corporal a cada 2 horas durante as 6 horas de recuperação do exercício (Ivy *et al.,* 1998).

No entanto, em estudo prévio no qual avaliamos corredores submetidos a sessões de exercícios de alta intensidade na vigência de ingestão aguda de CHO (~54g) ou placebo (PLA), constatamos que a suplementação de CHO não alterou o desempenho atlético e a percepção subjetiva ao esforço físico. A concentração elevada de lactato no grupo suplementado (CHO) pós-exercício ocorreu possivelmente devido à maior glicólise. A concentração de cortisol aumentou durante o exercício sem diferença significativa entre os grupos. Observamos aumento da glicemia durante o exercício em ambos os grupos, retornando aos valores pré-exercício na recuperação, indicando acentuada velocidade de captação da glicose após esforços intensos na tentativa de repor os estoques utilizados durante a sessão de corrida (de Sousa *et al.,* 2007).

Kristiansen *et al.* (2000) observaram aumento significativo de 33 e 22% na captação de glicose nas amostras de músculo de indivíduos treinados comparados com não treinados ($p<0,05$), quando o exercício foi feito na intensidade de 80 e 100% do VO_2máx, respectivamente. Os autores também verificaram que as quantidades de GLUT-4 foram 66% maiores nos indivíduos treinados.

Tanto em humanos como em ratos, a capacidade da insulina de ativar o processo de transporte de glicose é aumentada quando os estoques de glicogênio diminuem. Em ratos, o aumento dos efeitos estimulatórios da insulina no transporte de glicose por meio do recrutamento do GLUT- 4 ocorre quando as concentrações musculares de glicogênio encontram-se abaixo do normal. Entretanto, na ocorrência de um estado de supercompensação dos estoques de glicogênio muscular, a ação da insulina diminui. Dessa forma, o aumento da captação de glicose está relacionado à quantidade de glicogênio utilizado durante uma sessão de exercícios (Wojtaszewski *et al.,* 2002).

Diante do exposto, recomenda-se a ingestão de CHO no pós-exercício para a rápida recuperação dos estoques de glicogênio (Sousa e Tirapegui, 2005).

3.7.2 Efeitos da suplementação com carboidratos no treinamento intensivo *(Overload training)*

São poucos os estudos que avaliaram os efeitos da suplementação com CHO no período de treinamento de *overload.*

Achten *et al.* (2004) constataram melhora no desempenho físico e no estado de humor em corredores que receberam dieta com concentração de CHO de ~8g/kg de peso corporal, quando comparados aos da dieta restrita em CHO ~5g/kg de peso corporal (triagem controle - CON) durante período

de treinamento intensificado de 11 dias. Houve redução de 8,2±2,1% na *performance* de 16km na triagem CON.

No estudo de Kirwan *et al.* (1988), realizado durante 5 dias de treinamento intenso, foi observado aumento na percepção do esforço físico durante teste de desempenho de corredores que ingeriram ~4gCHO/kg de peso corporal, quando comparados aos da triagem com ~8g CHO/kg de peso corporal.

No experimento de Costill (1971), um grupo de corredores que percorreu a distância de 16Km a 80% do VO_2max, com ingestão moderada de CHO, não conseguiu ressintetizar o glicogênio durante os dias de teste e, no último dia, a concentração muscular foi reduzida em 50%. Mais tarde, Costill *et al.* (1988) observaram que dietas ricas em CHO, além de aumentarem os estoques de glicogênio muscular, melhoravam o estado de humor dos atletas.

3.8 Resposta hormonal no exercício: impacto na homeostase da glicose e nos estoques de glicogênio

Segundo Hargreaves (1995), no estado pós-absortivo, o organismo humano armazena ~100g de glicogênio no fígado e ~400g no músculo (Wasserman, 2009).

A homeostase da glicose requer controle integrado do organismo (Wasserman, 2009). Os componentes essenciais para regulação da glicemia

se comunicam entre si e essa comunicação se dá diretamente ou através de mecanismos humorais ou neurais (Coker e Kjaer, 2005).

A glicose é extraída do sangue para suprir o metabolismo de diversos tecidos. Em jejum, o cérebro consome 60% da glicose circulante de uma pessoa sedentária (Stryer, 1996). O fígado libera glicose, formada por glicogenólise ou gliconeogênese, na corrente sanguínea, em taxas equivalentes à captação da glicose sanguínea (Coker e Kjaer, 2005).

Embora os rins consigam produzir glicose, isso ocorre em menor proporção, quando comparado ao fígado. Estas adaptações ao exercício são conjugadas à diminuição da liberação de insulina, hormônio que inibe a saída de glicose do fígado e estimula a sua captação pelo músculo, fígado e tecido adiposo (Wasserman, 2009).

No que refere ao exercício, mecanismos independentes da insulina são ativados, aumentando a captação de glicose muscular, enquanto o fígado compensa esta maior demanda, aumentando a sua produção (Howlett *et al.,* 1999; Marliss e Vranic, 2002; Rose e Richter, 2005).

A velocidade de oxidação dos CHO pode aumentar 10 vezes durante o exercício - e mesmo após 1 hora, a glicose circulante é mantida em ~4g (Wasserman, 2009).

Durante o exercício, a degradação do glicogênio muscular impede a captação da glicose circulante por aumentar a glicose 6-fosfato (G6P), que inibe a ação da hexoquinase, enquanto a depleção do glicogênio hepático mantém a glicemia (Stryer, 1996; Jacobs e Sherman, 1999).

Segundo Tsintzas e Williams (1998), a glicemia pode se manter constante durante exercícios de intensidade moderada (60% do $VO2_{max}$) em indivíduos bem nutridos. Somente após exercícios muito prolongados (acima de 2 h), esta pode diminuir, resultando em hipoglicemia severa e neuroglicopenia (Wasserman, 2009).

Conforme mencionado, é concenso que os exercícios moderados e intensos utilizam os carboidratos como fonte primária de energia (Haff *et al.,* 2003; O'Brien *et al.,* 1993). Dessa forma, dias consecutivos de treinamento de longa duração, especialmente quando associados à ingestão insuficiente de CHO, resultam em diminuição dos estoques e prejuízo no processo de ressíntese de glicogênio muscular favorecendo a fadiga precoce.

3.8.1 Hormônios glicorreguladores no exercício

Segundo Coker e Kjaer (2005), as grandes modificações hormonais que ocorrem na fase final dos exercícios, quando a fadiga está se instalando, são causadas pela depleção do glicogênio hepático e muscular, pela incapacidade do organismo de manter a glicemia, e por fatores psicológicos, relacionados ao esforço físico intenso, desequilibrando o estado de bem-estar.

Dentre os hormônios envolvidos nesse processo, destacam-se: as catecolaminas, o cortisol e o glucagon. Esses hormônios têm função primordial na manutenção da glicemia em níveis normais, com concomitante

aumento na mobilização da glicose hepática, na maior utilização dos ácidos graxos livres e no aumento da gliconeogênese (Howlett *et al.,* 1999; Marliss e Vranic, 2002; Coker e Kjaer, 2005). As respostas desses hormônios são mais acentuadas quanto maior a duração do exercício (Marliss e Vranic, 2002).

No período de repouso alimentar, o glucagon é o responsável pela degradação do glicogênio hepático (Coker e Kjaer, 2005). Durante o exercício, a secreção desse hormônio se eleva e, à medida que a intensidade do esforço aumenta, a taxa de liberação de catecolaminas também aumenta, contribuindo no processo de glicogenólise, disponibilizando glicose para o músculo em contração (Urhausen *et al.,* 1995).

Apesar de estudos experimentais demonstrarem alta sensibilidade do fígado ao glucagon, o aumento na concentração periférica de glucagon durante o exercício é tardio e pouco intenso, quando comparado à elevada taxa de glicose produzida pelo fígado, induzida pela adrenalina (Wasserman, 2009). No entanto, como o glucagon, liberado pelo pâncreas, é inicialmente captado pelo fígado, isto atrasa sua entrada na circulação periférica (Wasserman, 2009). Assim, dependendo da duração do exercício, a concentração sanguínea periférica desse hormônio pode não aumentar, não refletindo adequadamente a sua resposta.

Durante o exercício físico, a insulinemia diminui devido ao aumento das concentrações das catecolaminas, que inibem a sua secreção (Ronald *et al*. (1994). As catecolaminas, em concomitância com os hormônios de

crescimento e cortisol, favorecem a mobilização de substratos gliconeogênicos (glicerol, ácidos graxos, aminoácidos) para o fígado (Stryer, 1996). Segundo Marliss e Vranic (2002), durante o exercício intenso (>80%VO_{2max}), o comando cerebral aumenta a atividade simpática e a concentração das catecolaminas circulantes em 14 a 16 vezes. Após o exercício, a inibição adrenérgica da secreção de insulina desaparece e as concentrações plasmáticas desse hormônio aumentam, favorecendo a síntese de glicogênio muscular (Marliss e Vranic, 2002; Coker e Kjaer, 2005).

A glicorregulação durante o exercício é sensível às oscilações da glicemia (Coker e Kjaer, 2005). Entretanto, no repouso, os hormônios contra-reguladores não se alteram até que a glicemia sofra queda acima de 25 mg/dL e, durante o exercício, se elevam após discreta redução da glicemia (menor que 8 mg/dL) (Wasserman, 2009).

3.9 Captação de glicose pelo músculo esquelético

Tanto a insulina quanto o exercício causam a translocação dos transportadores de glicose (GLUT-4) dos estoques intracelulares para a membrana plasmática, permitindo a captação celular de glicose (Fueger *et al.,* 2004).

Durante o exercício, as contrações musculares ativam vias intracelulares e a captação de glicose se dá por um processo independente de insulina (MacLean *et al.,* 2000; Kraniou *et al.,* 2006).

A regulação fisiológica da captação de glicose muscular *in vivo* é complexa, pois requer que a glicose passe do sangue para o interstício e, deste, para o espaço intracelular, onde ocorre a sua fosforilação em G6P (Rose e Ritcher, 2005). O fluxo sanguíneo no músculo e o recrutamento capilar determinam o movimento da glicose para o interstício e, dos transportadores da glicose, para a membrana, e a seguir, o transporte da glicose para dentro do miócito (Wasserman, 2009). Por fim, a atividade da hexoquinase no músculo define sua capacidade de fosforilar a glicose. Essa fosforilação é irreversível - e com essa reação, o processo de captação está completo (Rose e Ritcher, 2005).

Ainda segundo Rose e Ritcher (2005), o aumento do transporte de glicose durante o exercício ocorre principalmente devido à maior translocação do GLUT-4 para a membrana, mais especificamente no sarcolema e nos túbulos transversos (figura 2). Os principais componentes intracelulares envolvidos nesse processo são: cálcio, calmodulina, proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e óxido nítrico (MacLean *et al.,* 2000; Rottman *et al.,* 2002; Hardie e Sakamoto, 2006).

A AMPK é uma proteína quinase multifuncional do tipo serina/treonina que age como um importante sensor celular de carga energética, refletida nas relações AMP/ATP e creatina/fosfocreatina (Fujii *et al.,* 2006). A magnitude de ativação da AMPK é dependente da intensidade do exercício,

e pode estar relacionada ao maior estresse metabólico das fibras musculares recrutadas, em particular, as rápidas (MacLean, 2000; Rose e Richter, 2005).

O cálcio intracelular, liberado do retículo sarcoplasmático dos miócitos, se liga à calmodulina, proteína pequena com 4 sítios de ligação para o cálcio. Quando esses sítios são ocupados, a calmodulina muda de conformação, estimulando outras quinases, responsáveis por várias reações intracelulares, como por exemplo, a síntese de óxido nítrico (Rose e Ritcher, 2005). Segundo Inyard et al. (2007), tanto a atividade de óxido nítrico bem como a sua produção estão aumentadas durante o exercício.

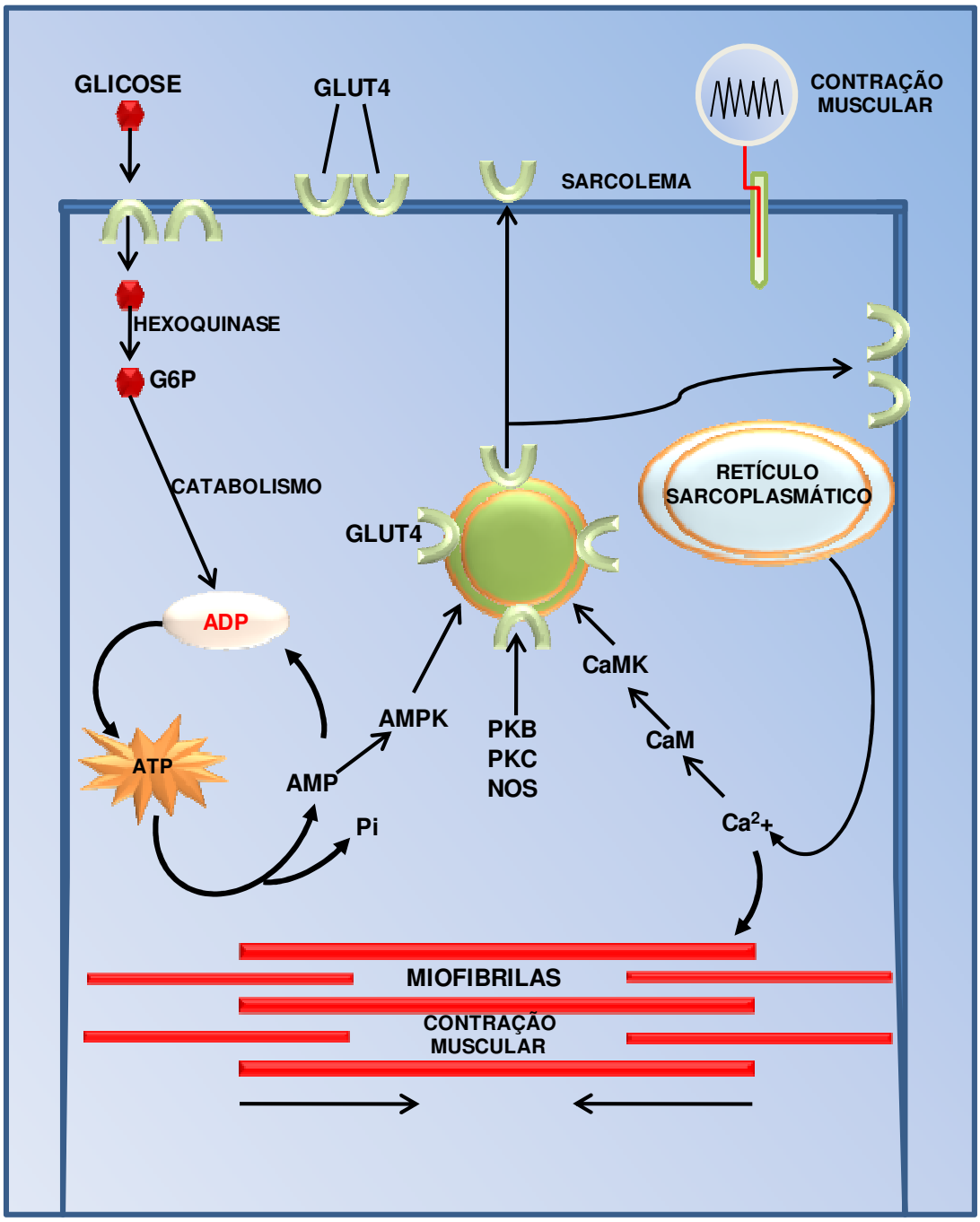


Figura 2. Translocação do GLUT4 e captação de glicose no músculo esquelético durante o exercício. Fonte: Adaptado de Rose e Richter (2005). G6P: glicose-6-P, GLUT4: proteína transportadora de glicose no músculo esquelético, Pi: fosfato, ATP: adenosina trifosfato, ADP: adenosina difosfato, AMP: adenosina monofosfato, AMPK: 5-AMP-proteína quinase ativada, CaM: calmodulina, CaMK: Cálcio-proteína quinase dependente de CaM, PKB: proteína quinase B (também conhecida como Akt), PKC: proteína quinase C, NOS: óxido nítrico sintase

3.10 Estoques de lipídios intramusculares – utilização, métodos de análise, dieta e treinamento

Os ácidos graxos livres circulantes e os oriundos dos lipídios extramiocelulares ou dos triglicerídeos plasmáticos são captados pelo músculo esquelético onde serão oxidados ou estocados como triacilglicerol intramiocelular (Johnson *et al.,* 2004).

O triacilglicerol intramiocelular é um importate substrato energético para o exercício (Belmonte e Aoki, 2005). A molécula de triacilglicerol é constituída por três moléculas de ácidos graxos associadas a uma molécula de glicerol e representa a forma como a gordura é estocada. Em seres humanos, a maior parte do triacilglicerol está armazenada no tecido adiposo, mas este também está presente, em menor proporção, no músculo esquelético e no plasma. A quantidade total de energia armazenada como triacilglicerol é de 80.000 a 140.000 kcal e chega a ser 60 vezes maior do que aquela na forma de glicogênio (1.700-2.000 kcal) (Tirapegui, 2005).

No músculo esquelético há dois destinos metabólicos para os lipídios: lipídio intramiocelular (LI) e extramiocelular (LE). O LI é responsável pelo equilíbrio dinâmico e pode ser utilizado rapidamente no metabolismo celular, sendo importante combustível nos exercícios de longa duração. O LE apresenta mobilização mais lenta, é utilizado como depósito energético celular e pode aumentar em casos de atrofia muscular (van Loon, 2004).

O LI e o LE são encontrados em cerca de 5 a 11% no músculo tibial anterior e em 4-12% no músculo sóleo, respectivamente (Kiens, 2006).

Essencialmente, dois métodos têm sido utilizados para mensurar o conteúdo de LI. A técnica de biópsia muscular com subsequente determinação bioquímica ou microscópica do conteúdo de LI e a espectroscopia por ressonância magnética (Johnson *et al.,* 2004).

A espectroscopia por ressonância magnética é um método não invasivo de quantificação dos triglicerídeos hepáticos e de lípidios no músculo esquelético (intramiocelular e extramiocelular) (Szczepaniak *et al.,* 1999). O pico de 1,5 partes por milhão (ppm) corresponde aos lipídios extramiocelulares (LE) – medidos pelos prótons CH2, o pico com 1,3 ppm aos lípidios intramiocelulares (LI) – prótons CH2 e o de 3,0 ppm, à creatina - prótons CH3. O pico dominante na espectroscopia em humanos é o da água, com freqüência de 4,7 ppm (Johnson *et al.,* 2004).

Dentre os fatores que afetam o conteúdo do triacilglicerol intramuscular destacam-se a dieta, o tipo de fibra muscular, o sexo e o treinamento físico (Kiens, 2006).

Um fator determinante do conteúdo de triacilglicerol no músculo esquelético humano é a composição da dieta. Na revisão de literatura feita por van Loon (2004), oito estudos experimentais, utilizando dietas ricas em gorduras, demonstraram seu forte impacto no conteúdo de LI, que aumentou 50-100% após a ingestão dessas dietas. Entretanto, quando ofertados dietas ricas em CHO, com ingestão de gorduras variando de 2 a 25% do valor calórico total, os estoques de LI diminuíram substancialmente em 10-30%.

A quantidade de LI pode variar de acordo com o tipo de fibra muscular. As fibras do tipo I (oxidativas) podem armazenar 3 vezes mais LI que as do tipo 2 (glicolíticas), em homens saudáveis e em ratos (Kiens, 2006). Assim, a concentração de LI é 2 a 3 vezes maior no músculo sóleo em relação ao tibial anterior (Johnson *et al.,* 2004).

O sexo também influencia o conteúdo de LI. Segundo Steffensen *et al.* (2002), as mulheres têm maior concentração basal de LI em relação aos homens, independentemente do estado de treinamento. Inclusive Kiens (2006) especula que as fibras musculares dos tipos I e II podem apresentar maiores concentrações de LI nas mulheres quando comparadas às dos homens, sugerindo mais estudos nessa área.

Por fim, o treinamento físico também pode influenciar o LI, aumentando seu conteúdo. Segundo Kiens (2006), diversos estudos longitudinais têm demonstrado aumento na concentração de LI no músculo vasto lateral após treinamento de longa distância em voluntários saudáveis após 2 semanas a 6 semanas.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Voluntários

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão Local de Ética em Pesquisa em seres humanos (Cappesq nº: 0127/08). Após assinar o termo de consentimento, 24 corredores de longa distância participaram do estudo. Esses corredores relataram ter em média 8,6±1,1 anos de treino, participando regularmente de competições estaduais, nacionais e internacionais. Os dados referentes à avaliação física e ao treinamento estão apresentados na tabela 1.

4.2 Desenho geral

Aproximadamente 4 a 5 dias antes do início do protocolo experimental, os corredores compareceram ao laboratório para coleta de amostras de sangue em jejum (basal, -9 dias), avaliação da capacidade cardiorrespiratória e determinação da composição corporal, através do exame de densitometria óssea (DEXA), e da concentração de triacilglicerol muscular através da ressonância magnética. Os corredores foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos, grupo carboidrato (CHO) ou grupo controle (CON), seguindo o modelo duplo-cego, e receberam dietas

com diferentes concentrações de CHO para serem seguida durante o período de treinamento intensivo. Após 8 dias de treino, os atletas realizaram sessões de exercícios intermitentes e foram avaliados quanto às respostas metabólicas, hormonais e de esforço físico. O teste de corrida de 3km, bem como o treinamento intensivo e a sessão de exercício intermitente foram feitas em pista de atletismo de material sintético do Estádio Constâncio Vaz Guimarães, na cidade de São Paulo, Brasil. A duração do estudo não ultrapassou 15 dias.

4.3 Testes preliminares de desempenho e de aptidão cardiorespiratória

Os atletas foram submetidos a um teste de desempenho em corrida de 3Km para cálculo da velocidade média (Vm_{3km}) e determinação da intensidade da sessão de exercício intermitente. A Vm_{3km} tem sido considerada como a velocidade dentro de um domínio de intensidade alta na qual o VO_{2max} é atingido durante as séries de exercício (Simões *et al.,* 1996; Simões *et al.,* 2005).

A avaliação da capacidade física foi feita usando o *SensorMedics Vmax metabolic cart* em esteira rolante na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Incor- HC FMUSP.

4.4 Dieta

Os corredores foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos (grupo CHO ou grupo CON). A dieta de ambos grupos foi isocalórica e com diferente concentração de CHO, sendo 61% no grupo CHO e 54% no grupo CON para ser seguida durante o período de treinamento intensivo. O grupo CHO recebeu 1 g/kg de peso corporal/h de maltodextrina para ser ingerida somente durante o treino no período da manhã, sendo esse valor incluído dentro dos 61% de CHO do grupo CHO. Ambos os grupos ingeriram água *ad libitum.* O estudo foi conduzido seguindo o modelo duplo-cego.

Os atletas receberam um formulário para registro dos tipos e das quantidades de todos os alimentos ingeridos antes e durante os 9 dias de treinamento intenso. Para auxílio na codificação dos alimentos do relato dietético, foi enviado, juntamente com o registro alimentar (RA), um manual de informações contendo fotografias de medidas caseiras, modelos e tamanhos de alimentos. Além das informações constatadas no RA e no manual, os voluntários receberam orientação individual de como preencher o registro, através de demonstrações de medidas caseiras, porções alimentares e volume. O cálculo nutricional dos macronutrientes e da energia foi realizado com o auxílio do *software* de Apoio à Decisão em Nutrição, versão 2.5 da UNIFESP/Escola Paulista de Medicina (1993) e da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006).

4.5 Desenho experimental

Após os testes preliminares e a 1ª coleta de sangue (basal, -9 dias), os participantes foram submetidos a 8 dias de treinamento intenso, totalizando 13 sessões, sendo 8 realizadas no período da manhã (1º ao 8º dia) e 5 no período da tarde (1 ao 5º dia), e re-avaliados no 9º dia. Esse programa de treinamento, contemplando corrida contínua e intermitente, foi concentrado predominantemente no período da manhã [3 dias de corrida intermitente (100% Vm_{3km}) realizada no 2º, 4º e 6º dias; 4 dias de corrida contínua (12-18 km a 80-90% Vm_{3km}) realizada no 1º, 3º, 5º e 8º dias; 1 dia de corrida contínua (20-25 Km a 70-80% Vmed3 Km) realizada no 7º dia]. No período da tarde, o programa de treinamento foi composto por corrida contínua de intensidade moderada (~50 min 75% Vm_{3km}), realizada do 1º ao 5º dia.

No 9º dia, os atletas compareceram ao local dos experimentos em jejum e, após a primeira coleta de sangue (basal, -140 min), aos 140 min antes do início do protocolo de exercícios, consumiram o café-da-manhã padronizado (energia: 770 kcal, carboidrato: 132,8g). O protocolo de exercícios intermitentes consistiu de 10 séries de 800m na velocidade correspondente a Vm_{3km}, com pausa de 1 min 30s entre as séries e dois testes máximos de 1.000m, sendo o 1º realizado antes (-20 min) do protocolo de exercícios intermitentes e o 2º teste, 20 min após o término da sessão (figura 3).

Conforme procedimento habitual da rotina de treino de cada um dos participantes, antes do início das sessões, os voluntários praticaram exercícios leves de aquecimento e alongamento durante 30 minutos [corrida 15 min (75% da FCmax) e 15 min de alongamento, exercícios de coordenação de corrida e corrida progressiva]. Durante os dias de treinamento intenso os atletas também foram orientados quanto ao controle das horas de sono, bem como para abster-se da realização de atividades extenuantes pelo menos 24 horas antes da realização dos testes.

Os participantes ingeriram solução contendo maltodextrina (grupo CHO) ou solução contendo aspartame como placebo para o grupo CON, ambas indistinguíveis com relação à cor.

Antes do início dos testes (-30 min), os atletas receberam 4 ml/kg de peso corporal de solução contendo CHO a 7% ou CON. Essa solução também foi oferecida imediatamente após o 1º teste de 1.000m. Durante o teste, eles ingeriram 2 ml/kg de peso corporal de solução contendo CHO a 7% ou PLA a cada duas séries, até o término do protocolo de exercícios, totalizando 5 momentos de ingestão (1, 3, 5, 7 e 9). Após o 2º teste de 1.000m, esses continuaram recebendo 3ml/kg de peso corporal de água contendo suplementação de CHO na concentração de 1,2 g/CHO/kg peso corporal ou PLA aos 0 e 60 min do período de recuperação (figura 3). Entre os intervalos do período de recuperação os atletas ingeriram água *ad libitum*. A temperatura da solução CHO ou PLA ingerida durante os testes não ultrapassou a faixa de 4 a 7º C. Ao final de cada série a escala de Borg com pontuação de 6 a 20 foi aplicada com o objetivo de avaliar a percepção

subjetiva ao esforço físico (PSE) (Borg, 2000). O atleta informava ao avaliador a pontuação mínima de 6, indicando baixa percepção ao esforço físico, até a máxima de 20, indicando sensação extrema. Antes, durante e após a realização das sessões, foi monitorada a frequência cardíaca (FC) dos atletas (Sport Tester, Polar Electro, OY, Kempele, Finland). Nos dias dos testes, a temperatura do ambiente esteve entre 19,4-25º C, com umidade entre 60–76%.

No 9º dia, as amostras de sangue foram coletadas em seis momentos descritos a seguir [jejum (basal, -140 min), antes do aquecimento (-30 min), imediatamente após a realização das 10 séries de 800m, imediatamente após o 2º teste máximo de 1.000m e aos 15 min e 80 min pós-exercício (recuperação) (figura 3)].

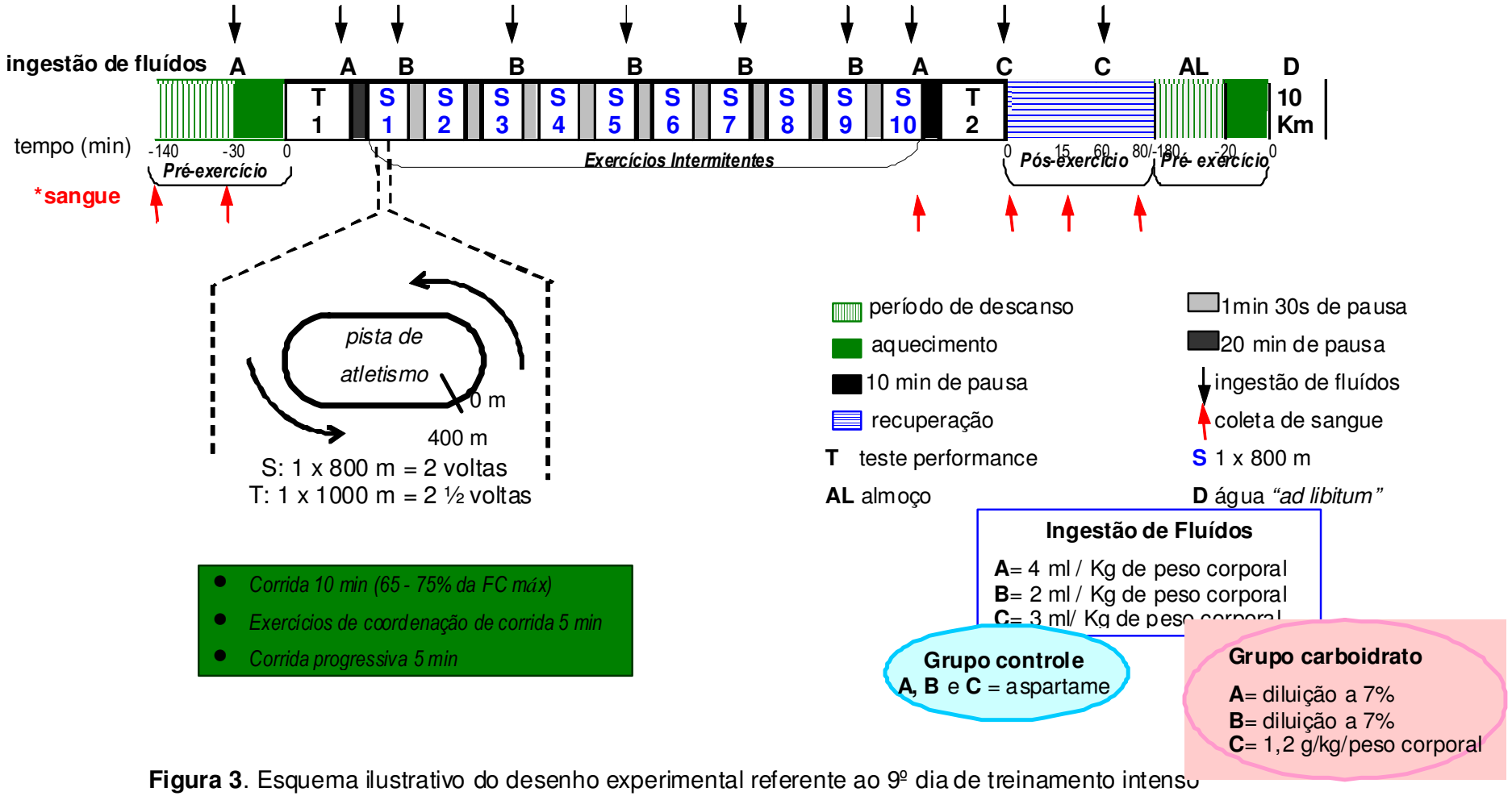


Figura 3. Esquema ilustrativo do desenho experimental referente ao 9º dia de treinamento intenso

4.6 Coleta e análise das amostras sanguíneas

Foram coletados amostras de sangue venoso em sete momentos distintos [basal (-9 dias), basal (-140 min), pré-exercício (-30 min), após 10x800m, após o 2º teste de 1.000m e aos 15 e 80 min do período de recuperação] para determinação da concentração plasmática de glicose, lactato, epinefrina, DNA livre, e sorológica, de ácidos graxos livres, insulina, hormônio do crescimento (GH), cortisol, testosterona, testosterona livre, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), *insulin-like growth factor* (IGF-1), *insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP-3) e das enzimas creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

As amostras de sangue para as dosagens de glicose e lactato foram centrifugadas em microcentrífuga refrigerada (4^0C) a 3.000 rpm por 10 min, sendo o tubo mantido o tempo todo no gelo e o plasma heparinizado, separado dentro da primeira hora. Essas amostras plasmáticas foram fracionadas, estocadas a -70^0C, para determinação de lactato e, de glicose, a -20^0C.

Para a dosagem da glicose plasmática utilizou-se o método enzimático glicose oxidase-peroxidase, com kit comercial da Labtest Diagnóstica GOD-ANA/método, sendo posteriormente lidas em espectrofotômetro UV/Visível ULTROSPEC modelo 3100 pro. As concentrações plasmáticas de lactato sanguíneo foram determinadas em um analisador de lactato (Yellow Springs Instruments - 2700 YSI).

Os soros, para determinações dos hormônios e parâmetros bioquímicos, foram centrifugados no aparelho Sorvall RC3 Plus a 4^0C a 2.000 rpm (rotor H-2000B) por 15 min e as alíquotas foram mantidas congeladas a -20^0C.

Os ácidos graxos livres foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico específico (ACS-ACOD) utilizando reagentes da WAKO Pure Chemicals Industries.

A insulina foi determinada por radioimunoensaio fase-líquida. Utilizou-se kit LINCO (cat # HI-14K).

A adrenalina foi dosada por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) com detecção eletroquímica no InCor HCFMUSP. Utilizou-se reagentes da marca Millipore.

IGF1, IGFBP3 e o cortisol foram determinados pelo método imunoquimioluminométrico com o kit Immulite, Siemens, Los Angeles, USA.

As concentrações de testosterona total e GH foram mensuradas pelos métodos imunofluorométrico e fluoroimunoensaio, respectivamente, pelo sistema automatizado AutoDELFIA e kits da marca WALLAC, Perkin Elmer, Finlândia.

Para a determinação de DNA livre plasmático utilizou-se kit de DNA QIAsymphony Mini (Qiagen). A leitura foi realizada em triplicata por meio de PCR em tempo real modelo ABI 7900HT da *Applied Biosystems, Foster City, CA*. As reações foram realizadas pelo método Taqman. A mistura 10x gCyc continha 3 µM de *primer* sense: ACATGGGTACTAAGCAACAAAATAAG, 3 µM *primer* antisense: CACAATTGGAACATCTTTGTTAAAC e 2 µM sonda

Fam-TTGCAGACAAGGTCCCAAAGACAGCA-Tamra. As condições de amplificação foram inicialmente de 2 min a 50° C e 10 min a 95° C, seguida de 50 ciclos de 15 s a 95° C e 60 s a 60° C.

As análises das enzimas CK, LDH, AST e ALT foram realizadas utilizando o método cinético UV.

A contagem total de leucócitos foi realizada por meio de análise automatizada em esfregaços corados com corantes panóptico usando um microscópio óptico. O número absoluto de cada tipo celular foi calculado a partir da contagem total de leucócitos.

Os hormônios GH, cortisol, testosterona, testosterona livre, FSH, LH, IGF1, IGFBP3 foram analisados no Laboratório de Toxicologia – Hormônio e Genética Molecular (LIM 42), e as enzimas e a contagem total de leucócitos, no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

4.7 Espectroscopia de prótons por ressonância magnética para determinação da concentração de triacilglicerol intramiocelular

A concentração de triacilglicerol intramiocelular foi mensurada nos músculos tibial anterior e sóleo através de espectroscopia de prótons por Ressonância Magnética (ERM) antes e após o programa de treinamento intenso, segundo metodologia de Rotman *et al.* (2000) e Szczepaniak *et al.*

(1999), respectivamente. Os atletas relizaram o exame de RM no InCor – HCFMUSP. O modelo do aparelho utilizado foi GE Signa LX CVI 1,5 T.

Nenhum dos voluntários era claustrofóbico ou apresentava alguma contra-indicação à realização da ressonância magnética.

Para a mensuração dos lipides da perna esquerda por ERM foi utilizada bobina de quadratura de joelho e a imagem axial foi adquirida na sequência em gradiente-eco (TR 47 ms, TE 15 ms, espessura de 2 mm) dos músculos tibial anterior e sóleo a cerca de 10 cm do platô tibial medial. O voxel de 16 cm^3 foi posicionado sobre o ventre muscular do soleo, realizada calibração *(shimming)*, supressão de água e obtido o espectro. O mesmo processo foi repetido para avaliação do músculo tibial anterior. Os metabólitos analisados foram os lipídios intramiocelular e extramiocelular. Para determinar as concentrações desses metabólitos específicos, utilizamos o *software* de domínio público *Magnetic Ressonance User Intereface (MRUI)* (http://www.mrui.uab.es/), destinado ao pré-processamento e quantificação de sinais de MRS in-vivo.

4.8 Análise estatística

Todas as variáveis estão apresentadas como média e erro padrão (EPM). Para as variáveis sanguíneas que apresentaram distribuição normal, a análise de variância *Two Way* com medidas repetidas foi utilizada para se verificar possíveis diferenças entre os grupos CHO e CON. Se significativa, o

Tukey correction foi aplicado como *post hoc* para detectar diferenças múltiplas. O teste t para amostras não pareadas foi utlizado nas variáveis dietéticas, antropométricas, psicológicas, de composição corporal, de treinamento e de *performance* física para comparar as médias entre os grupos, e o teste t pareado foi utilizado para comparar as médias entre os momentos. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal foi utilizado teste não paramétrico equivalente. O nível de significância estatística foi de 5%. Foram utilizados os *softwares* SPSS versão 10.0.1 e Sigma Plot versão 11.0.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 População de estudo

Os resultados relacionados às características de treinamento dos participantes do presente estudo estão apresentados na tabela 1, classificando-os como atletas de alto rendimento. A maioria dos atletas pertence à etnia parda (41,7%), seguido de branca (33%) e negra (25%).

Tabela 1. Dados de avaliação física e de treinamento (Média ± EPM) dos 24 corredores competitivos participantes do estudo (grupo CHO: n=12; grupo CON: n= 12)

Variáveis	**CHO**	**CON**	**valor de p (CHO[1] *vs.* CON[2])**
Idade (anos)	29,1±1,6	26,9±1,9	0,40
Estatura (cm)	169,5±2,0	170,2±2,5	0,84
Peso (Kg)	60,2±1,4	62,3±1,6	0,34
% Gordura corporal[3]	8,3±0,3	9,9±0,5	0,004
Melhor resultado 10-km (min)	29,7±0,4	31,6±0,4	0,002
Teste de 3 km (min)	8,5±0,1	9,3±0,1	0,001
Fcmáx (bpm)	175,9±1,4	177,5±2,4	0,60
VO_2 máx (ml/Kg/min)	69,8±2,2	68,5±1,9	0,67
Tempo de treino (anos)	9,5±1,6	7,4±1,2	0,35

[1]CHO: grupo carboidrato, [2]CON: grupo controle, [3]Avaliado por densitometria óssea (DEXA; Hologic QDR – 2000 W).

Nenhum dos atletas relatou apresentar doença grave. Entretanto, é importante ressaltar que dos 24 atletas avaliados, 18 apresentaram pelo menos uma lesão anterior. Foram relatados: tendinites (45,8%), contusões

(20,8%), fraturas (12,5%), contraturas (8,3%) e periostite (4,1%). Dentre as lesões destacaram-se: lesões no joelho (25%), fascite plantar (20,8%), lesões na perna (12,5%), lesões no pé (8,3%), lesão de quadril (4,1%), inflamação no ciático (4,1%), lombalgias (4,1%) e pubalgias (4,1%).

Os atletas participantes desse estudo não informaram o uso de medicamentos.

Dos 24 atletas, 20 (83,3%) relataram o consumo de suplementos nutricionais. Dentre os suplementos consumidos pelos atletas destacaram-se: carboidratos (58,3%), multivitamínicos (41,7%), vitamina C (33,3%), complexo B (29,1%), ferro (29,1%), aminoácidos (25%), vitamina E (4,1%), vitamina B12 (4,1%), cálcio (4,1%), zinco (4,1%) e magnésio (4,1%).

5.2 Dieta e programa de treinamento

5.2.1 Dieta habitual

Os atletas do grupo CHO apresentaram consumo energético habitual de 58,2±2,7 kcal/kg de peso corporal, compreendendo 59,6±1,4% de CHO, 15,6±0,7% de proteínas e 24,8±1,8% de lipídios. Os do grupo CON apresentaram ingestão habitual de 51,3±1,7 kcal/kg de peso corporal, sendo 54,8±1,8% de CHO, 16,7±0,6% de proteínas e 28,2±1,3% de lipídios.

5.2.2 Registro alimentar durante o treinamento intenso

Nenhuma diferença significativa foi observada quanto à ingestão energética de ambos os grupos (CHO: 64,9±4,7 *vs.* CON: 56,6±3,1 kcal/kg de peso corporal). A ingestão de CHO foi maior no grupo CHO (9,9±0,7 g/kg) *vs.* 7,7±0,6 g/kg de peso corporal do grupo CON ($p<0,05$). Os valores percentuais de CHO, lipídios e proteínas no grupo CHO foram 60,8±0,9%, 23,4±0,8% e 15,4±0,6%, respectivamente. No grupo CON esses valores foram 53,9±1,1%, 28,3±0,8% e 17,5±0,5%, respectivamente (tabela 2).

Tabela 2. Ingestão energética e de macronutrientes (Média±EPM) dos corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo

	CHO	**CON**	**valor de p (CHO[1] *vs.* CON[2])**
Energia			
kcal	3811,0±205,0	3440,0±169,0	NS
kcal/kg peso corporal	64,9±4,7	56,6±3,1	NS
Carboidratos			
%	60,8±0,9	53,9±1,1	0,0001
g	579,3±31,9	467,5±31,3	0,0203
g/kg peso corporal	9,9± 0,7	7,7±0,5	0,0257
Proteínas			
%	15,4±0,6	17,5±0,5	0,0066
g	147,1±11,0	149,2±6,7	NS
g/kg peso corporal	2,5±0,2	2,5±0,1	NS
Lipídios			
%	23,4±0,8	28,3±0,8	0,0004
g	99,1±6,5	107,2±4,1	NS
g/kg peso corporal	1,7±0,1	1,8±0,1	NS

[1]CHO: grupo carboidrato, [2]CON: grupo controle

Os voluntários permaneceram com o peso relativamente estável durante o programa de treinamento (CHO: 60,2±1,4 kg e 60,4±1,3 kg; CON: 62,3±1,6 kg e 62,7±1,8 kg, antes e depois, respectivamente). A duração total do programa detreinamento foi de 624,1±23,5 min no grupo CHO e 578,5±12,6 min no grupo CON, sem diferença entre ambos.

5.3 Sessão de corrida intermitente e teste de 1.000m

Com relação à sessão de corrida intermitente, não foram observadas diferenças entre os tempos decorridos entre a primeira (1ª) e a última (10ª) série de 800m de ambos os grupos (CHO: 136,4±1,3 min *vs.* 139,5±2,1; CON: 147,9±2,1 *vs.* 154,0±2,6 min, respectivamente). A queda percentual dos tempos (% da diferença) entre as séries 1-5 e 6-10 foi semelhante entre os grupos CHO (1,6±0,5%) e CON (3,0±0,9%). Foi observada queda no desempenho no 2º teste de 1.000m de ambos os grupos, sendo esse percentual menor no grupo CHO 5,3±1,0% *vs.* 10,7±1,3% do CON ($p<0,05$) (tabela 3).

Tabela 3. Tempo médio (±EPM) da sessão de corrida intermitente (10x800m) e testes de 1.000m em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo.

	CHO	CON	valor de p (CHO[1] *vs.* CON[2])
10 séries de 800m			
Tempo médio (min)	23,3±0,3	25,3±0,4	0.0002
***Perfrmance* de 1.000m**			
1º 1.000m (s)	158,6±1,4	164,2±2,0	0.03
2º 1.000m (s)	167,1±2,0[a]	181,5±2,2[a]	<0.0001
Diferença 1.000m (1-2) (%)	5,3±1,0	10,7±1,3	0.0035

a: diferença significativa quando comparada à 1ª série ($p<0.05$), [1]CHO: grupo carboidrato, [2]CON: grupo controle

5.4 Frequência cardíaca e percepção subjetiva de esforço físico

Na sessão de corrida intermitente não houve diferença na magnitude da frequência cardíaca (FC) média das 10 séries de 800m (CHO: 181,9±1,6 bpm e CON:184,9±2,3 bpm – tabela 4) e na FC média entre as séries 1-5 (CHO: 179,7±1,7 bpm e CON: 183,4±2,4 bpm) e 6-10 (CHO: 184,0±1,6 bpm e CON: 186,4±2,2 bpm) dos dois grupos entre si. Esses valores médios de FC estiveram ainda significativamente acima da FC_{max} obtida através de exame ergoespirométrico (tabela 1).

Quando comparada a 1ª série da sessão de treinamento intermitente (CHO: 175,6±1,6 bpm; CON: 175,8±2,2 bpm) com as demais, observou-se que a FC do grupo CHO aumentou após a 4ª série (182,3±1,6 bpm, $p<0,05$) enquanto que no grupo CON esse aumento foi evidenciado antecipadamente na 3ª série (184,6±2,8 bpm, $p<0,05$) (tabela 4).

Ainda quanto à FC, não houve diferença após os 2 testes máximos de 1.000m entre os dois grupos (CHO: 177,9±2,7 bpm e 177,9±2,4 bpm, CON: 184,0±2,7 bpm e 183,8±3,1 bpm, respectivamente) (tabela 4).

Tabela 4. Frequência cardíaca (Média±EPM) durante as 10 séries de 800m e corrida máxima de 1.000m em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo.

Freqüência cardíaca (bpm[3])	**CHO**	**CON**	**valor de p (CHO[1] *vs.* CON[2])**
10 séries de 800m[a,b]			
Pré-exercício	109,7±3,1[b]	119,7±3,5[b]	0,04
1x800m	175,6±1,6	175,8±2,2	NS
2x800m	179,8±1,6	182,8±2,7	NS
3x800m	179,3±2,1	184,6±2,8[a]	NS
4x800m	182,3±1,6[a]	185,0±2,5[a]	NS
5x800m	182,3±2,0[a]	184,7±2,6[a]	NS
6x800m	183,1±1,6[b]	186,0±2,3[b]	NS
7x800m	184,7±2,0[b]	186,3±2,5[b]	NS
8x800m	183,1±1,8[b]	186,5±2,2[b]	NS
9x800m	184,0±1,6[b]	186,1±2,3[b]	NS
10x800m	184,9±1,7[b]	186,9±2,0[b]	NS
Média das séries	181,9±1,6	184,9±2,3	NS
Teste de 1.000m[d]			
Pré-teste	93,2±4,9[d]	100,5±4,8[d]	NS
1º teste	176,0±3,6	177,2±5,3	NS
2º teste	178,1±2,1	184,6±2,7	NS

a: diferença quando comparada à 1ª série ($p<0,05$), b: diferença significativa quando comparada à 1ª série ($p<0,01$), d: diferença significativa quando comparada ao 1º teste de 1.000m ($p<0,01$), [1]CHO: grupo carboidrato, [2]CON: grupo controle, [3]bpm: batimentos por minuto

Tabela 5. Percepção subjetiva do esforço físico (Média±EPM) durante as 10 séries de 800m e corrida máxima de 1.000m em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo

	CHO	**CON**	**valor de p CHO *vs.* CON**
10 séries de 800m			
Percepção Subjetiva[ξ]			
Pré-exercício	9,9±0,7	10,8±1,0	NS
1ª série	14,1±0,8	12,5±0,5	NS
10ª série	18,9±0,5	18,2±0,4	NS
Diferença (séries 1 – 5; 6 -10)	14,1±0,8	16,5±2,6	NS
%Diferença (séries 1 – 5; 6 -10)	19,8±3,7	24,4±4,3	NS
Média das séries	16,6±0,5	15,8±0,4	NS
Corrida máxima de 1.000m			
Percepção Subjetiva[ξ]			
Pré-teste 1º 1.000m	6,8±0,3	8,3±0,7	NS
Pré-teste 2º 1.000m	11,7±0,9[b]	13,0±0,9[b]	NS
%Diferença Pré-teste (1-2)	74,6±15,6	67,1±17,7	NS
1º 1.000m	16,3±0,7	14,7±0,6	NS
2º 1.000m	17,5±0,4	17,6±0,7[b]	NS
%Diferença 1.000m (1-2)	8,8±4,2	21,0±5,7	NS

ξ: pontuação de Borg, a: diferença quando comparada à pontuação pré-teste ($p<0,05$), b: diferença significativa quando comparada à 1ª série ($p<0,05$), [1]CHO: grupo carboidrato, [2]CON: grupo controle

Conforme ilustrado na tabela 5, a pontuação média da escala de Borg, imediatamente antes da realização das 10 séries de 800m, foi 10. Após a 1ª série de 800m foi 13, chegando próximo a 19 ao término da sessão de exercícios, sem diferença significativa entre os grupos. Ao comparar os testes máximos de 1.000m, não foi observado aumento significativo da percepção ao esforço físico

no grupo CHO (1º: 16,3±0,7 *vs.* 2º: 17,5±0,4). Tal diferença foi significativa no grupo CON (1º: 14,7±0,6 *vs.* 2º: 17,6±0,7).

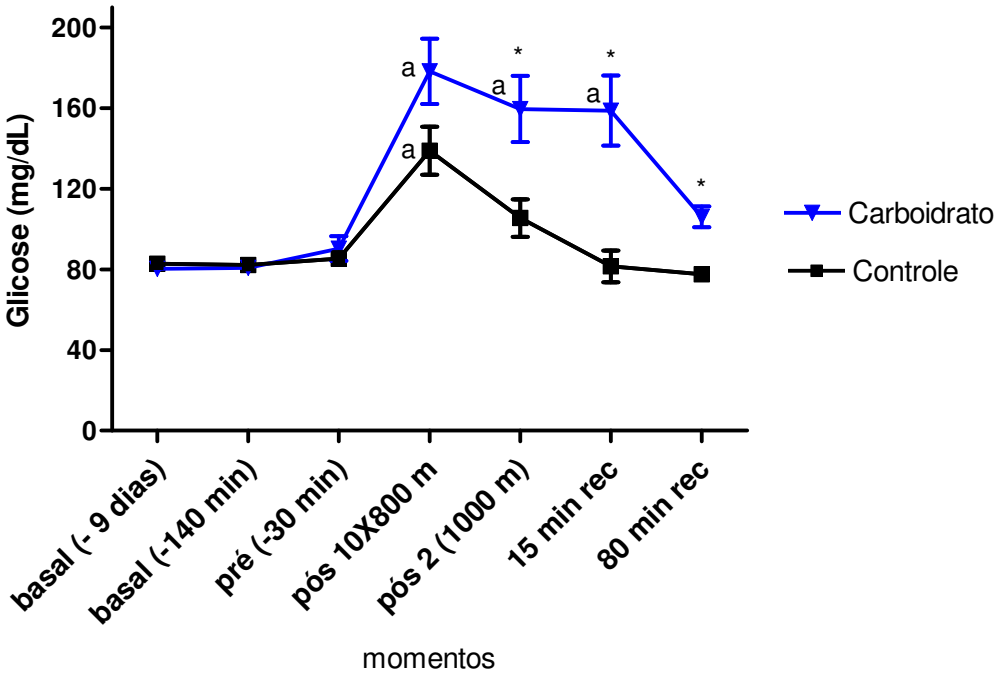
5.5 Metabólitos e hormônios

5.5.1 Valores basais

Os valores basais, antes e após 8 dias de treinamento, de glicose, lactato, ácidos graxos livres (AGL), insulina, GH, epinefrina, cortisol, IGF-1, IGFBP-3, FSH e da relação testosterona/cortisol não diferiram entre os tratamentos (CHO e CON) (figuras 4-9 e 13-16).

As concentrações de testosterona total e de sua fração livre foram maiores no grupo CHO quando comparadas ao CON (testosterona total: 694,0±54,6 ng/dL *vs.* CON: 610,8±47,9 ng/dL; testosterona livre: 552,667 pmol/L *vs.* 395,742 pmol/L) ao término do treinamento físico (figuras 10 e 11). Resposta semelhante foi observada para o hormônio LH (4,6±0,6 UL/mL *vs.* CON: 2,9±0,3 UL/mL, figura 12).

Os valores basais de IGF-1 não se alteraram após 8 dias de treinamento no grupo CHO [basal (-9 dias): 223,7±21,9 ng/ml; basal (-140 min): 226,0±14,8 ng/ml] e aumentaram no grupo CON [basal (-9 dias): 222,5±18,7 ng/ml; basal (-140 min): 261,9± 26,5 ng/ml, $p<0,05$) (figura 15).



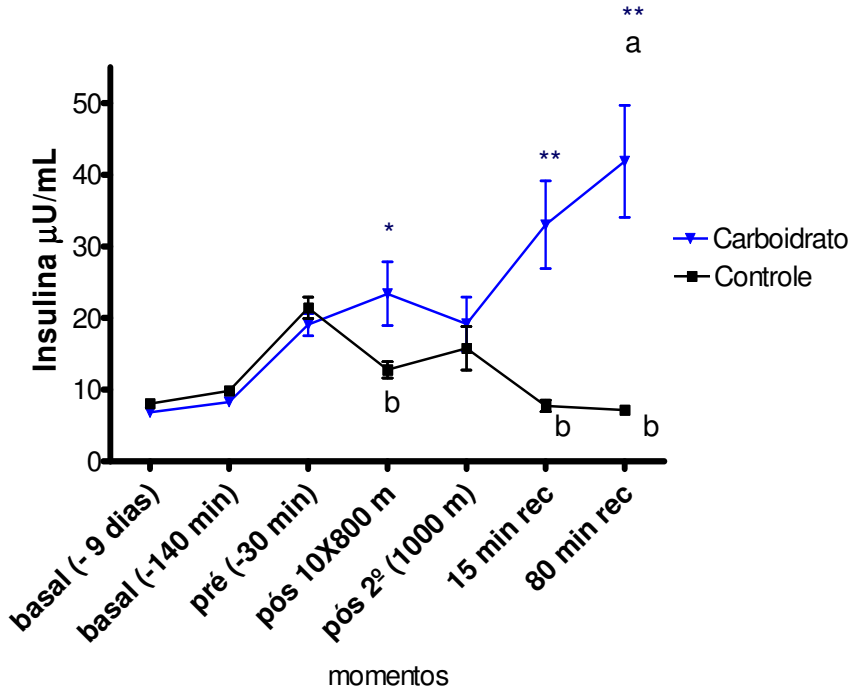


Figura 4. Concentração plasmática de glicose e sérica de insulina (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) ($p<0,05$), b: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) ($p<0,01$), *: diferença significativa entre grupos ($p<0,05$), **: diferença significativa entre grupos ($p<0,01$)

5.5.2 Protocolo de testes (9º dia)

As concentrações de glicose se elevaram após as 10 séries de 800m em ambos os tratamentos quando comparadas às do pré-exercício (-30 min) ($p<0,05$). Essas concentrações se mantiveram elevadas no grupo CHO, sendo esta diferença ainda significativa após a 2ª sessão de exercícios de 1.000m (159,6±16,4 mg/dL) e aos 15 min da recuperação (158,8±17,3 mg/dL).

As concentrações glicêmicas foram significativamente maiores no grupo CHO após o 2º teste de 1.000m (159,6±16,4 mg/dL) e na recuperação (15 min: 158,8±17,3 mg/dL e 80 min: 106,1±5,2 mg/dL) quando comparadas às do grupo CON (105,5±9,3 mg/dL, 81,5±7,9 mg/dl e 77,7±1,6 mg/dL, respectivamente) (figura 4). Concomitantemente, as concentrações de insulina mantiveram-se significativamente aumentadas no grupo CHO após as 10x800m (23,4±4,4 µU/mL) e aos 15 min (33,0±6,1 µU/mL) e 80 min (41,9±7,8 µU/mL) da recuperação, contra 12,8±1,2; 7,7±0,8; e 7,2±0,6 µU/mL do grupo CON, respectivamente (figura 4).

Os valores epinefrina (pré-exercício - CHO: 28,6±7,5 pg/mL; CON: 35,8±12,9 pg/mL) aumentaram em ambos os grupos após as 10x800m (CHO: 348,0±144,6 pg/mL, $p<0,05$; CON: 360,2±85,2 pg/mL, $p<0,01$). No pós-exercício, a concentração de epinefrina retornou rapidamente aos valores basais em ambos os grupos (figura 5).

A concentração sérica pré-exercício de GH foi similar nos 2 grupos (CHO: 0,8±0,4 ng/mL; CON: 1,1±0,5 ng/mL) e aumentou após as 10 séries de 800m (CHO: 21,8±5,6 ng/mL, $p<0,01$; CON: 36,7±5,0 ng/mL, $p<0,01$) e ao término do

2º teste de 1.000m (CHO: 12,1±30 ng/mL, p<0,05; CON: 14,1±2,1 ng/mL, p<0,01). Tal elevação foi significativamente atenuada no grupo CHO ao término do protocolo de corrida intermitente (21,8±5,6 ng/mL *vs.* CON: 36,7±5,0 ng/mL, p<0,01) (figura 6).

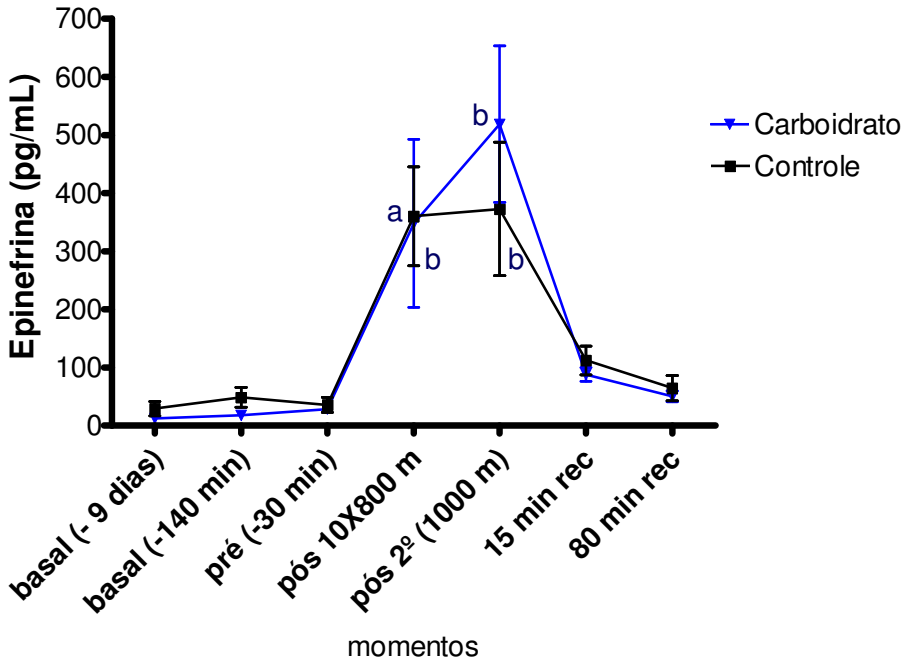


Figura 5. Concentração plasmática de epinefrina (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) (p<0,05), b: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) (p<0,01)

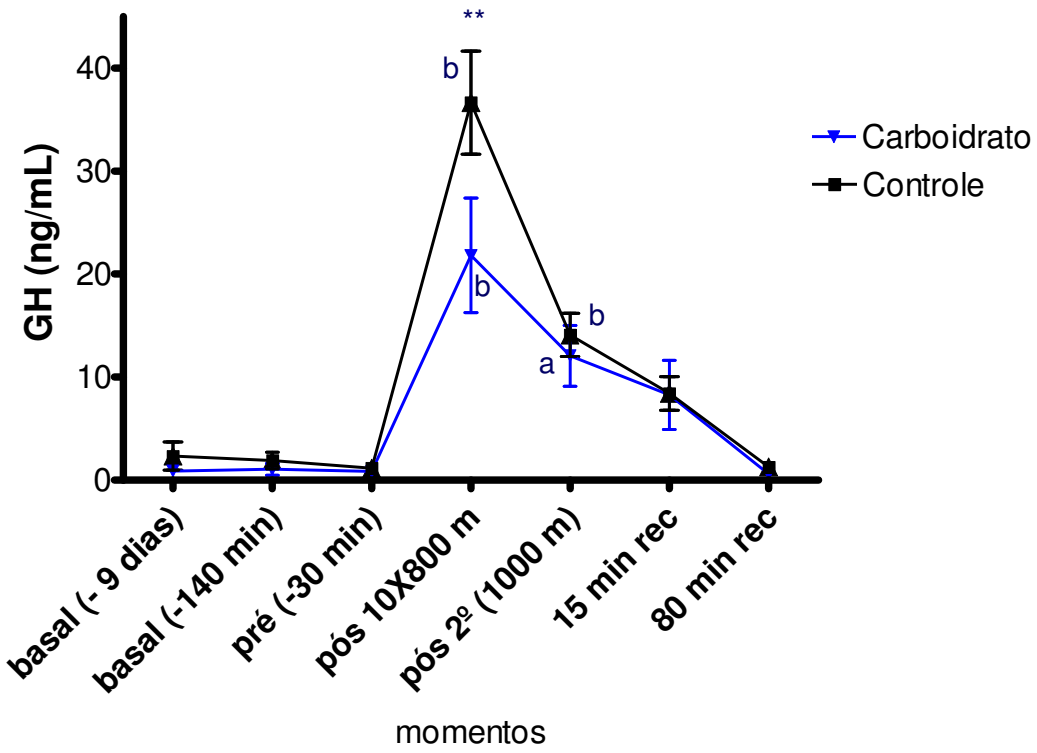


Figura 6. Concentração sérica do hormônio do crescimento (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) ($p<0,05$), b: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) ($p<0,01$), **: diferença significativa entre grupos ($p<0,01$)

A lactacidemia aumentou após a sessão de exercícios intermitentes (pré: 1,2±0,1 e 1,1±0,1 mmol/L; pós: 7,0±0,5 e 6,8±0,4 mmol/L, para os grupos CHO e CON, respectivamente) permanecendo elevada até os 15 min de recuperação em ambos os grupos (CHO: 4,7±0,3 mmol/L e CON: 4,2±0,4 mmol/L) ($p<0,01$). Não foram encontradas diferenças entre grupos (figura 7).

As concentrações plasmáticas de AGL não se alteraram no grupo CHO durante todo o experimento desde o início ao término das atividades do 9º dia. Ao comparar os grupos, a ingestão de CHO suprimiu a elevação dos ácidos

graxos aos 15 min (0,2±0,0 mEq/L *vs.* CON: 0,6±0,1 mEq/L, p<0,01) e aos 80 min (0,1±0,0 mEq/L *vs.* CON: 1,5±0,1 mEq/L, p<0,01) do período de recuperação (figura 8).

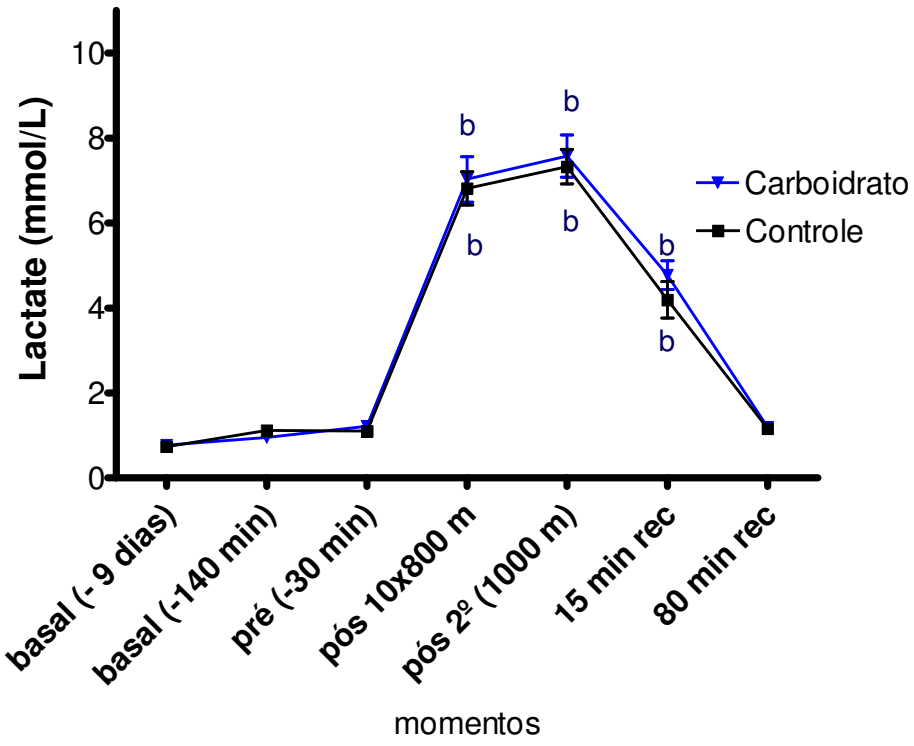


Figura 7. Concentração plasmática de lactato (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. b: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) (p<0,01)

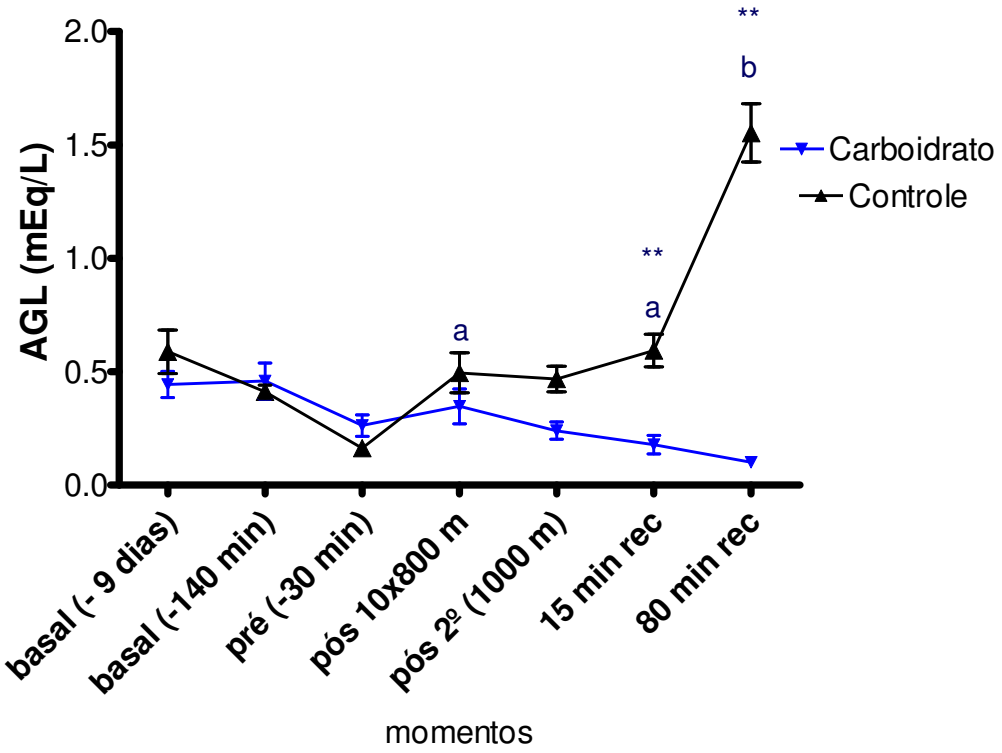


Figura 8. Concentração sérica de ácidos graxos livres (AGL) (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) ($p<0,05$), b: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) ($p<0,01$), **: diferença significativa entre grupos ($p<0,01$)

O exercício elevou as concentrações de cortisol em ambos os grupos (p<0,05) mas esta resposta foi atenuada no grupo CHO, imediatamente após a sessão de exercícios (22,4±0,9 *vs.* CON: 27,6±1,4 pmol/L) e aos 80 min do período de recuperação (15,5±1,0 *vs.* CON: 23,6±1,3 pmol/L) (figura 9).

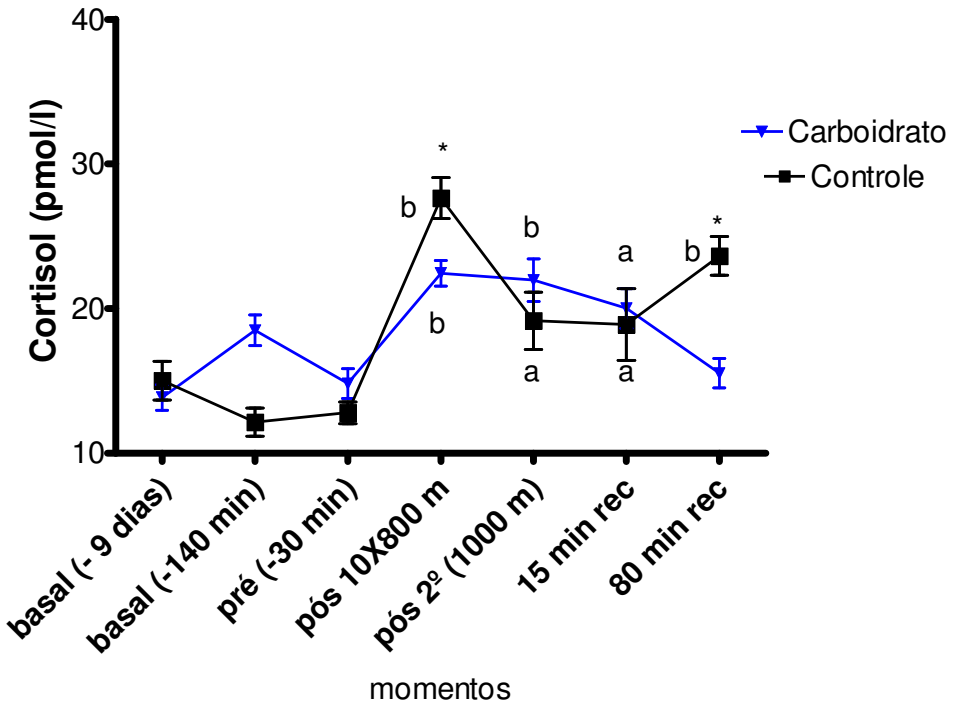


Figura 9. Concentração sérica de cortisol (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) (p<0,05), b: diferença quando comparada ao momento pré (-30 min) (p<0,01), *: diferença significativa entre grupos (p<0,05)

Em ambos grupos, os valores de testosterona diminuíram, sendo esta diferença significativa aos 80 min de recuperação em relação ao momento basal pré-exercício (CHO: 390,0±35,7 e 771,7±34,2 pmol/L *vs.* CON: 341,5±57,9 e

600,7±60,7 pmol/L, respectivamente – figura 10) ($p<0.05$). Resposta semelhante foi observada para a fração livre da testosterona (figura 11).

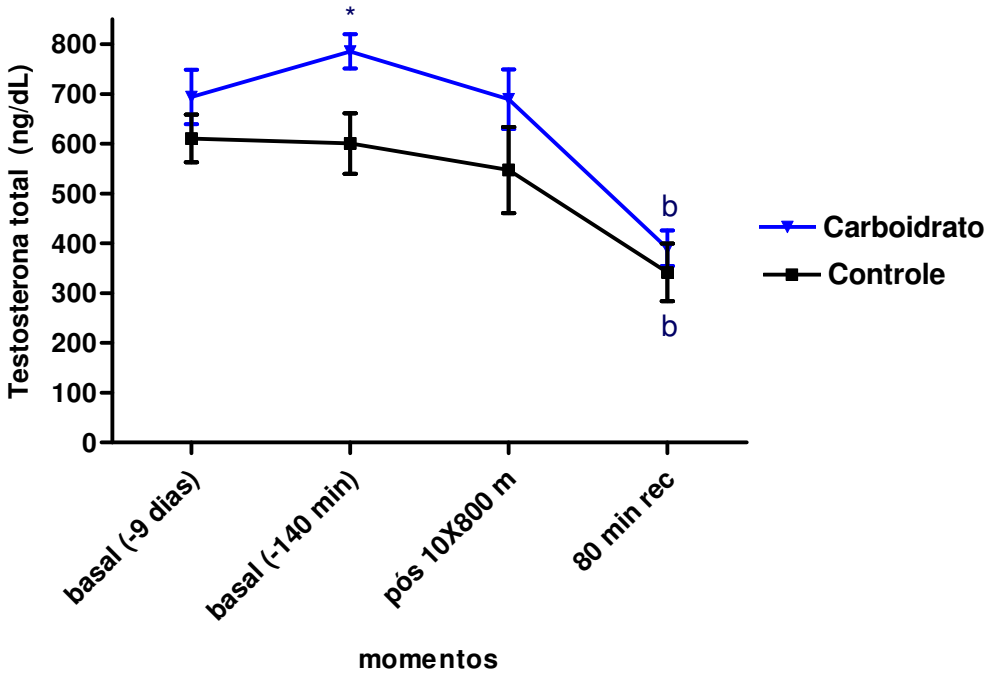


Figura 10. Concentração sérica de testosterona total (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. b: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) ($p<0,01$), *: diferença significativa entre grupos ($p<0,05$)

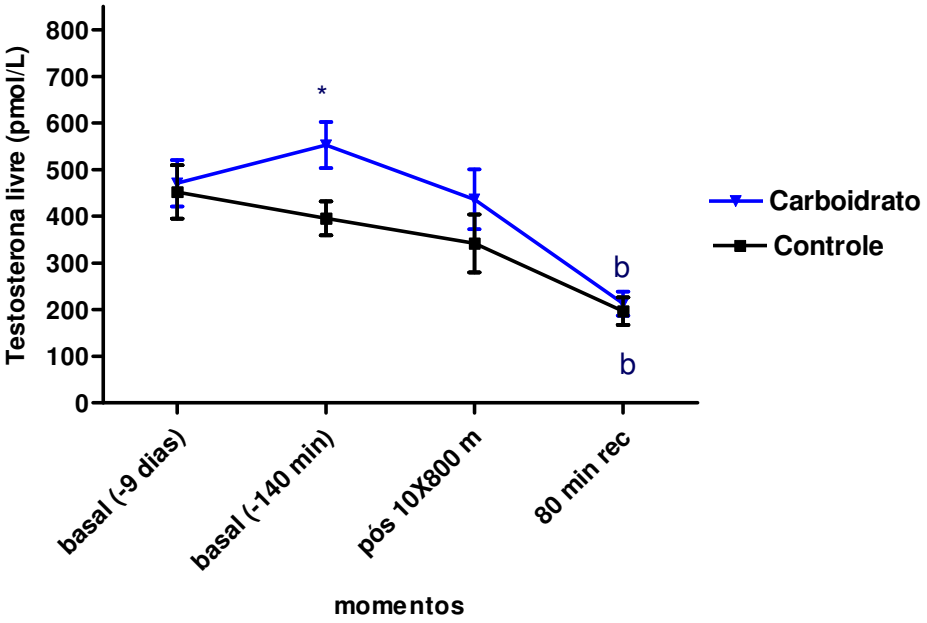


Figura 11. Concentração sérica de testosterona livre (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. b: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) (p<0,01), *: diferença significativa entre grupos (p<0,05)

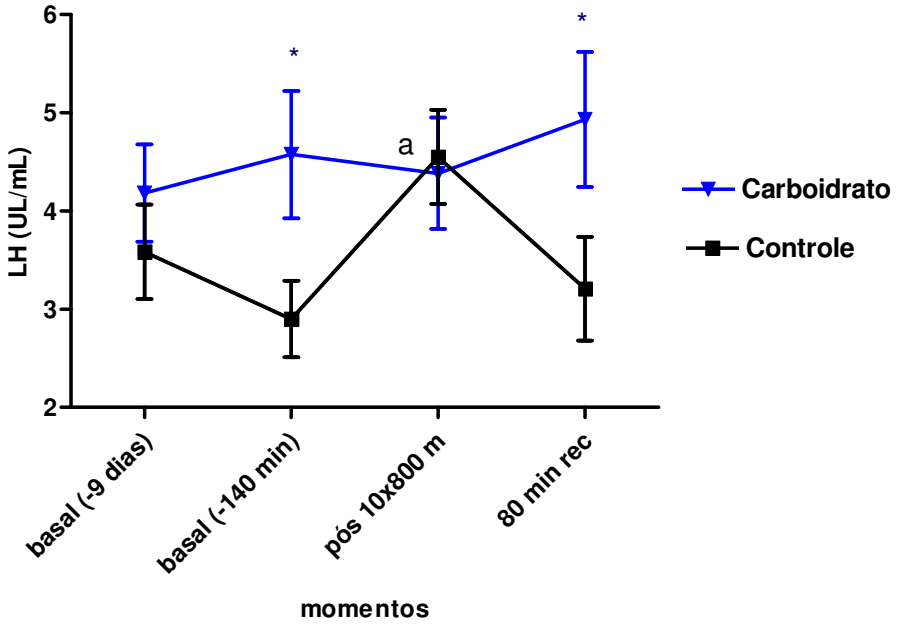


Figura 12. Concentração sérica de LH (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) (p<0,05), *: diferença significativa entre grupos (p<0,05)

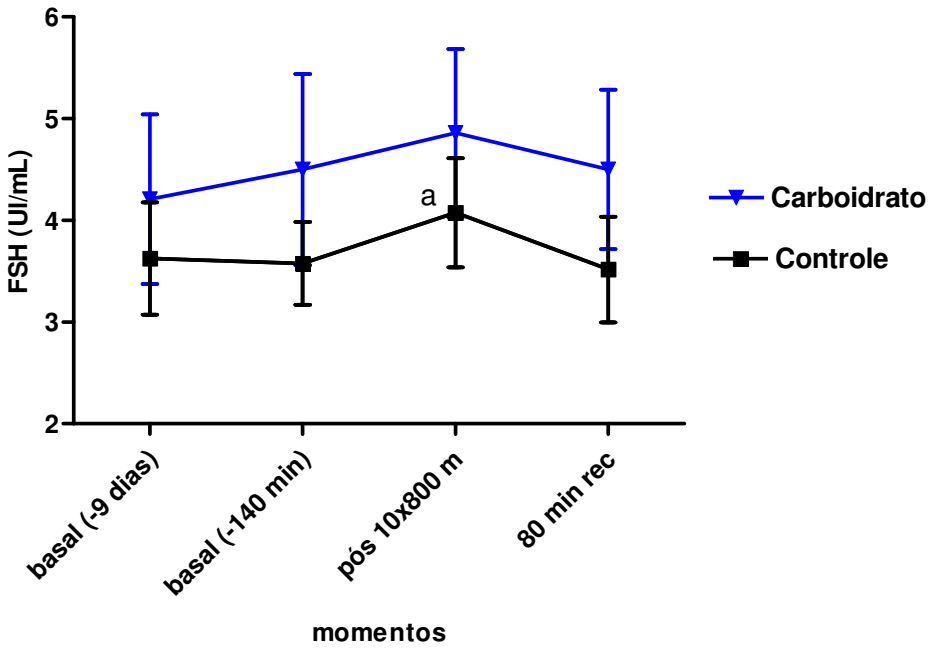


Figura 13. Concentração sérica de FSH (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) ($p<0,05$)

Os valores de FSH e LH aumentaram no grupo CON ($p<0,05$) após as 10x800m, mas sem repercussão sobre os valores de testosterona.

Ao comparar as concentrações de FSH entre grupos, não foram observadas alterações significativas ao longo do estudo (figura 13). Já os valores de LH foram maiores no grupo CHO no momento pré-exercício (4,6±0,6 UL/mL *vs.* CON: 2,9±0,4 UL/mL, $p<0,05$) e aos 80 min do período de recuperação (4,9± 0,7 UL/mL *vs.* CON: 3,2±0,5 UL/mL, $p<0,05$) (figura 12).

A relação testosterona/cortisol não diferiu entre os grupos ($p<0,05$) (figura 14). Ao comparar com os valores basais pré-exercício (-140 min), essa relação foi menor no grupo CHO somente aos 80 min de recuperação (-140 min: 43,0±2,5 e 80 min rec: 27,3±4,2) e no grupo CON após as 10x800m e na

recuperação (-140 min: 54,3±7,5, pós 10x800m: 20,6±3,4 e 80 min rec: 15,2±2,9, p<0,05).

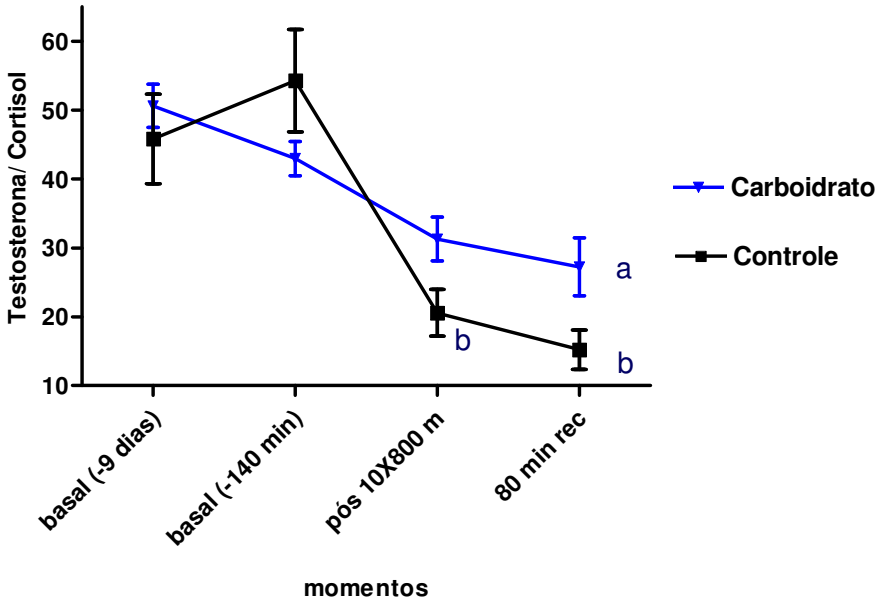


Figura 14. Relação testosterona/ cortisol (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) (p<0,05), b: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) (p<0,01).

Os valores de IGF-1 não diferiram entre os grupos (figura 15). No entanto, quando comparados aos valores pré-exercício, foi observado aumento no grupo CHO após as 10x800m (226,0±14,8 ng/ml e 265, 6±18,1 ng/ml, respectivamente; p<0,05).

Não houve alteração nas concentrações de IGFBP-3 durante e após as sessões de exercícios (figura 16).

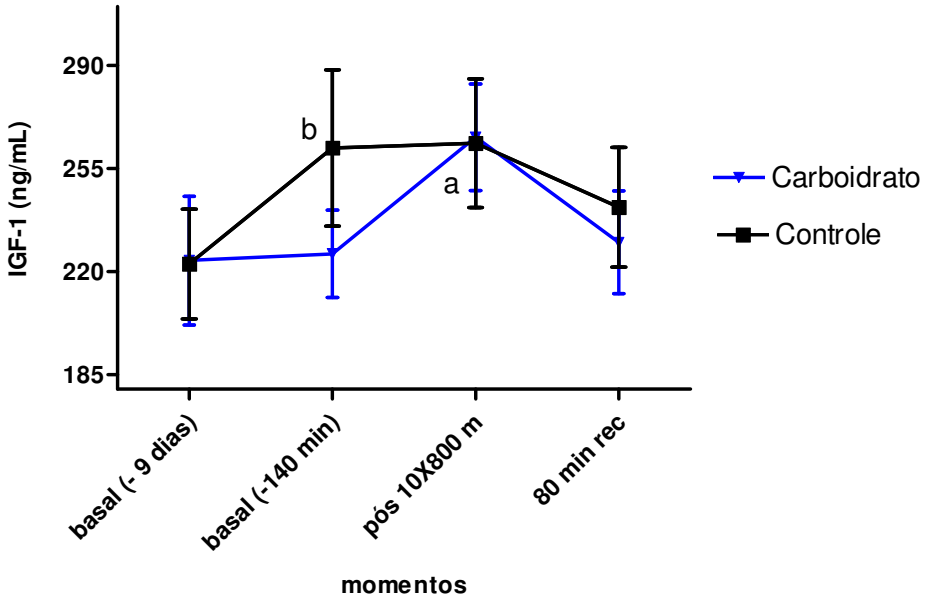


Figura 15. Concentração sérica (Média±EPM) de IGF-1 em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) ($p<0,05$), b: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) ($p<0,01$).

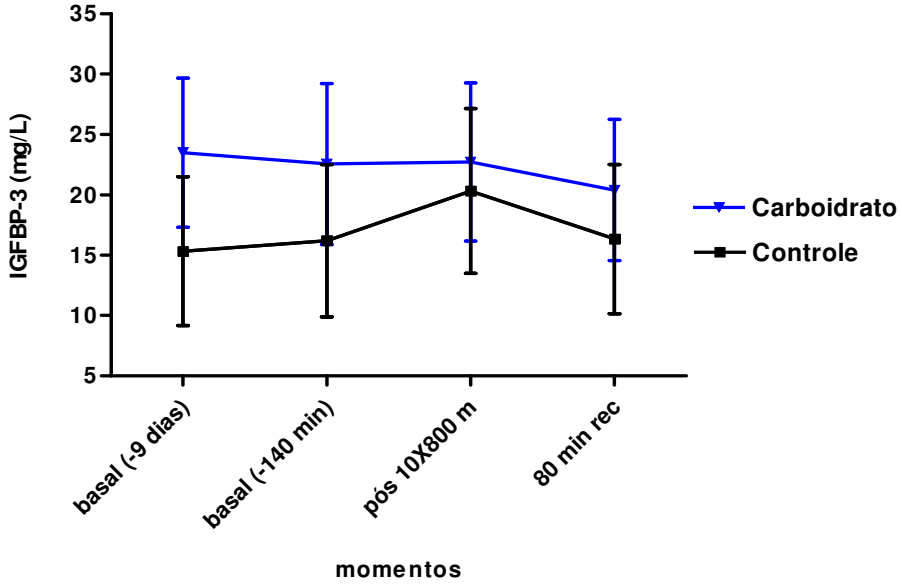


Figura 16. Concentração sérica de IGFBP-3 (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo.

A relação IGF-1/ IGFBP-3, aumentou no grupo CHO após as 10x800m em relação ao pré-exercício (56,8±2,4 e 50,5±2,1, respectivamente, p<0,05) (figura 17).

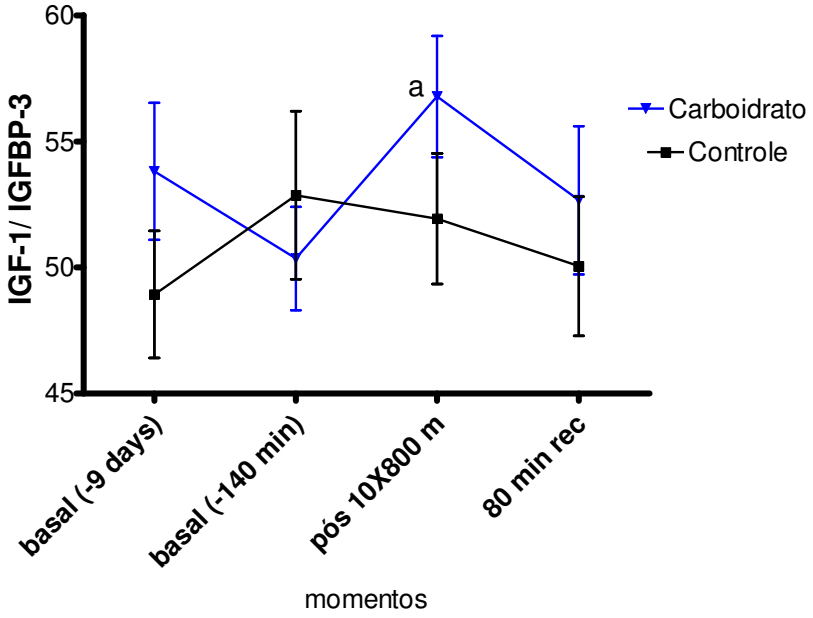


Figura 17. Relação IGF-1/ IGFBP-3 (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) (p<0,05).

5.6 Valores de lipídios intramiocelulares e extramiocelulares mensurados por Ressonância Magnética

Foram comparadas as diferenças nas concentrações de LI antes e após o microciclo de treinamento intensivo. Independentemente do músculo avaliado, o acréscimo de LI (em relação à água) foi maior no grupo CHO (+0,0061±0,0022 e +0,0008±0,0043 vs. CON: -0,0091±0,0053 e

-0,0224±0,0151; para os músculos tibial anterior e sóleo, respectivamente) (tabela 6 e figura 18).

Quanto às concentrações de LE dos músculos tibial anterior e sóleo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (tabela 6).

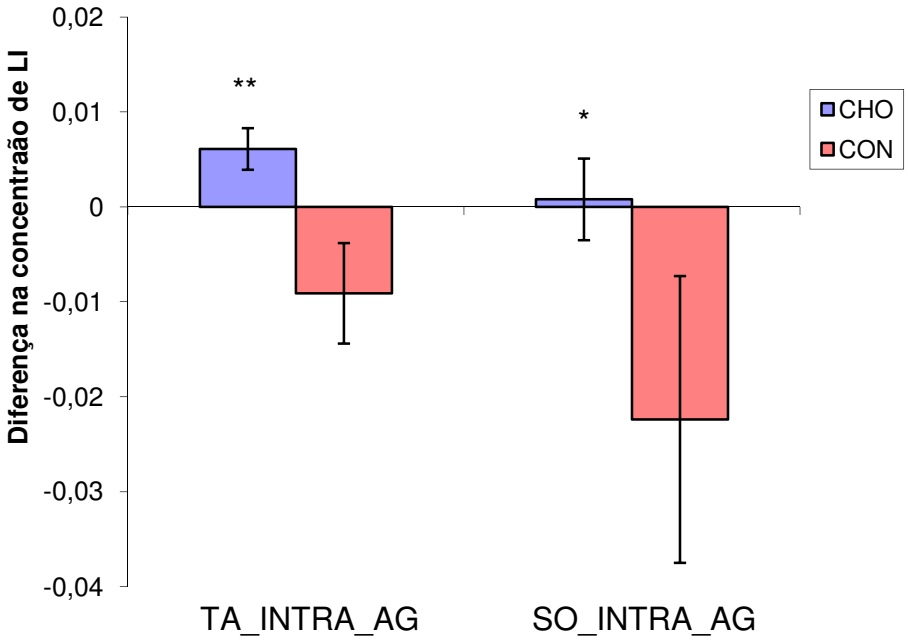


Figura 18. Diferença na concentração de lipídio intramiocelular (LI) antes e após treinamento intensivo em corredores competitivos suplementados com carboidratos (Média±EPM). *: diferença significativa entre grupos (p<0,05); **: diferença LI no músculo tibial anterior (em relação a àgua), SO_INTRA_AG: variação na concentração de LI no músculo sóleo

Tabela 6. Diferença na concentração de lipídio intramiocelular (LI) antes e após treinamento intensivo em corredores competitivos suplementados com carboidratos (Média±EPM)

Variável	grupo	n	Média (±EPM)	valor de p#
TA_INTRA_AG[1]	CHO	11	0,0061 (±0,0022)	0,009
	CON	12	- 0,0091 (±0,0053)	
TA_EXTRA_AG[2]	CHO	11	0,0011 (±0,0047)	0,316
	CON	12	- 0,0100 (±0,01126)	
SO_INTRA_AG[3]	CHO	11	0,0008 (±0,0043)	0,037
	CON	12	- 0,0224 (±0,0151)	
SO_EXTRA_AG[4]	CHO	11	- 0,0129 (±0,0064)	0,651
	CON	12	- 0,0229 (±0,0238)	

#Teste de comparação de médias: teste de Mann-Whitney, [1]TA_INTRA_AG: tibial anterior- lipídio intramiocelular em relação à água, [2]TA_EXTRA_AG: tibial anterior- lipídio extramiocelular em relação à água, [3]SO_INTRA_AG: sóleo- lipídio intramiocelular em relação à água, [4]SO_EXTRA_AG: sóleo- lipídio extramiocelular em relação à água

5.7 Marcadores de lesão tecidual e contagem de leucócitos

5.7.1 Valores basais

Os valores basais antes (-9 dias) e após (-140 min) 8 dias de treinamento intenso não foram diferentes entre os grupos CHO e CON para a contagem de leucócitos e DNA livre plasmático (tabela 7 e figura 19).

Os valores basais de LDH permaneceram constantes após 8 dias de treino no grupo CHO (de 449,1±18,2 para 474,3±22,8 U/L). Em contrapartida, aumentaram no grupo CON (de 413,5±23,0 para 501,8±24,1 U/L; $p<0,05$ – figura 20).

Nenhuma diferença significativa foi observada para CK em ambos os grupos (figura 21).

Quanto às aminotransferases, no início do programa de treinamento, o grupo CHO apresentou níveis mais elevados de AST em relação ao grupo CON ($p <0,05$). No entanto, esta diferença não foi mais evidente no final do programa de treinamento (tabela 8).

5.7.2 Protocolo de corrida intermitente (9º dia)

Não foram observadas alterações significativas na contagem de neutrófilos circulantes após o exercício (tabela 7). O número de linfócitos aumentou após 10x800m ($p <0,01$), e o de neutrófilos, no período de recuperação em ambos os grupos ($p <0,001$). Os monócitos elevaram-se somente no grupo CON ($p <0,01$). A ingestão de CHO atenuou o aumento dos monócitos circulantes após as 10x800m ($p <0,01$) e, ainda mais, aos 80 min de recuperação, quando comparado ao grupo CON ($p <0,001$). Para o grupo CHO, todas estas mudanças resultaram em redução na contagem total de leucócitos pós-exercício e durante o período de recuperação, quando comparado à do grupo CON ($p <0,01$) (tabela 7).

Tabela 7. Contagem de leucócitos e subpopulações de células brancas (1.000 células/ µL ou mm^3) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo (Média±EPM)

	Grupo	Basal (-9 dias)	Basal (-140 min)	Pós 10x800m	80 min pós exercício
Leucócitos	CHO	5,1±0,5	5,4±0,4	9,1±0,1**[b]	10,6±0,1**[c]
	CON	5,3±0,3	6,2±0,6	12,2±0,7[c]	13,9±1,1[c]
Monócitos	CHO	0,4±0,1	0,4±0,0	0,4±0,1**	0,5±0,1***
	CON	0,4±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	0,9±0,2[b]
Linfócitos	CHO	1,7±0,1	1,8±0,2	3,4±0,6[b]	1,0±0,1
	CON	1,8±0,1	1,8±0,2	3,5±0,5[c]	1,7±0,2
Neutrófilos	CHO	3,0±0,3	3,0±0,3	5,1±0,6	9,4±0,8[c]
	CON	3,1±0,2	4,6±1,0	7,1±0,5	10,9±1,5[c]

b: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) ($p<0,01$), c: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) ($p<0,001$), **: diferença significativa entre grupos ($p<0,001$), ***: diferença significativa entre grupos ($p<0,001$)

A concentração de DNA livre no plasma aumentou após a corrida intermitente (10x800m) em ambos os grupos ($p<0,01$) e retornou aos valores pré-exercício (-140 base min) aos 80 min do período de recuperação. Após as 10x800m, a concentração de DNA livre no plasma foi menor no grupo

CHO (48.240,3±5.431,8 alelos/ mL) quando comparada à do grupo CON (73.751,8±11.546,6 alelos/ mL, p<0,01) (figura 19).

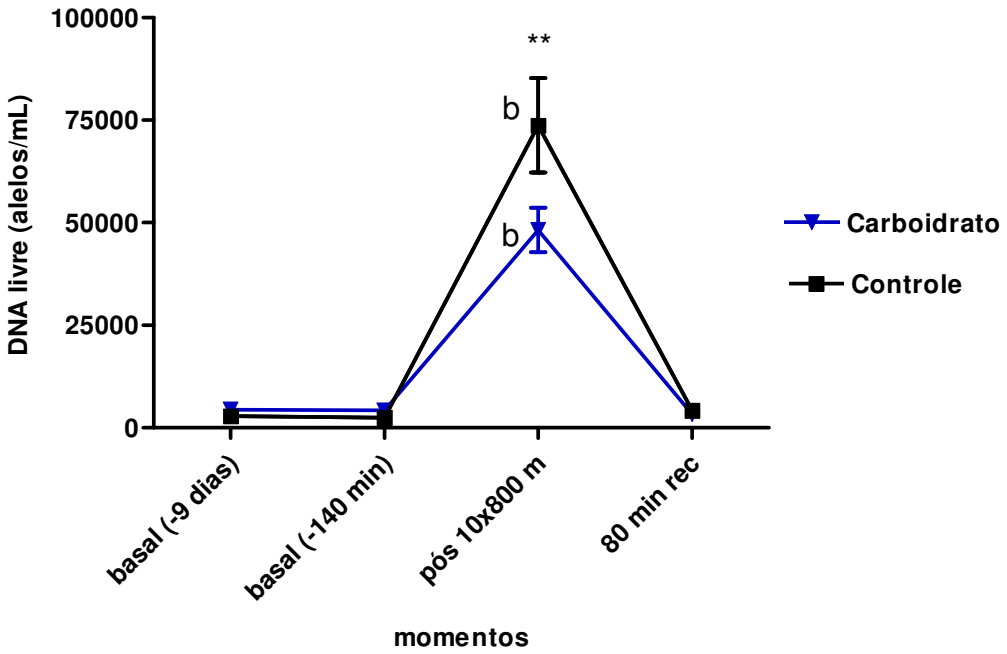


Figura 19. Concentração plasmática de DNA livre (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. b: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) (p<0,01), **: diferença significativa entre grupos (p<0,01)

No grupo CON, as concentrações de LDH aumentaram após as 10x800m (p<0,01) e permaneceram elevadas aos 80 minutos do período de recuperação (p<0,05). Após as 10x800m, as concentrações de LDH foram menores no grupo CHO (509,2 ± 23,1 U/L) quando comparado ao grupo CON (643,3 ± 32,9 U/L, p <0,01) (figura 20).

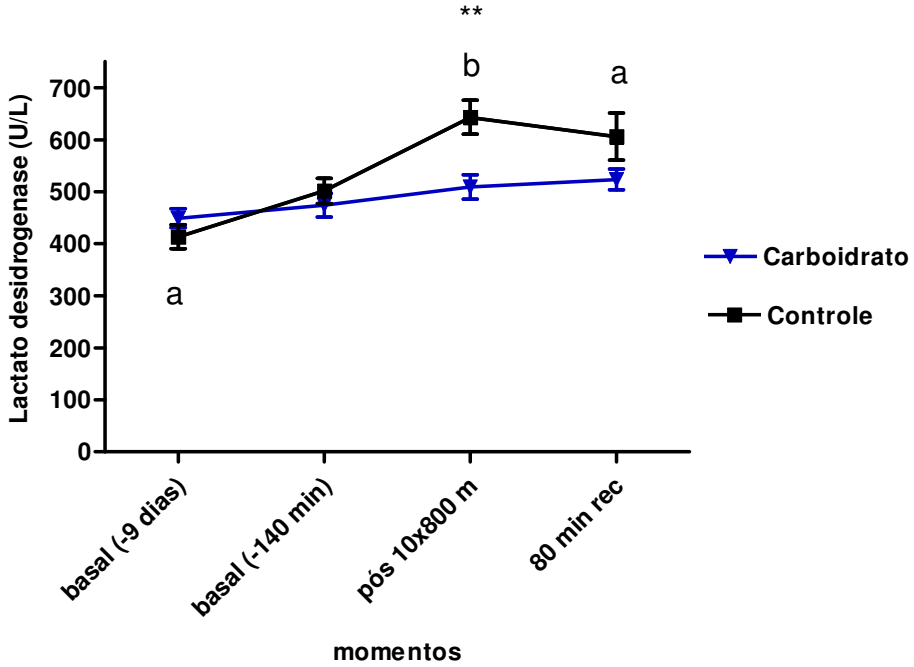


Figura 20. Concentração sérica de lactato desidrogenase (LDH) (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) ($p<0,05$), b: diferença quando comparada ao momento basal (-140 min) ($p<0,01$), **: diferença significativa entre grupos ($p<0,01$)

As concentrações de creatina quinase e das aminotransferases (AST e ALT) não se alteraram em ambos os grupos durante o protocolo de corrida do 9º dia (figura 21 e tabela 8).

Tabela 8. Concentrações séricas das aminotransferases AST e ALT (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo.

	Grupo	Basal (-9 dias)	Basal (-140 min)	Pós 10x800m	80 min Rec
AST	CHO	44,8±5,7*	38,8±3,0	48,2±7,0	45,8±4,7
	CON	31,5±2,0	32,7±3,3	41,5±4,7	40,8±4,5
ALT	CHO	37,5±6,4	37,4±6,1	40,7±7,9	41,8±7,6
	CON	28,8±2,7	28,8±2,9	31,9±3,5	31,1±3,0

*: diferença significativa entre grupos ($p<0,05$)

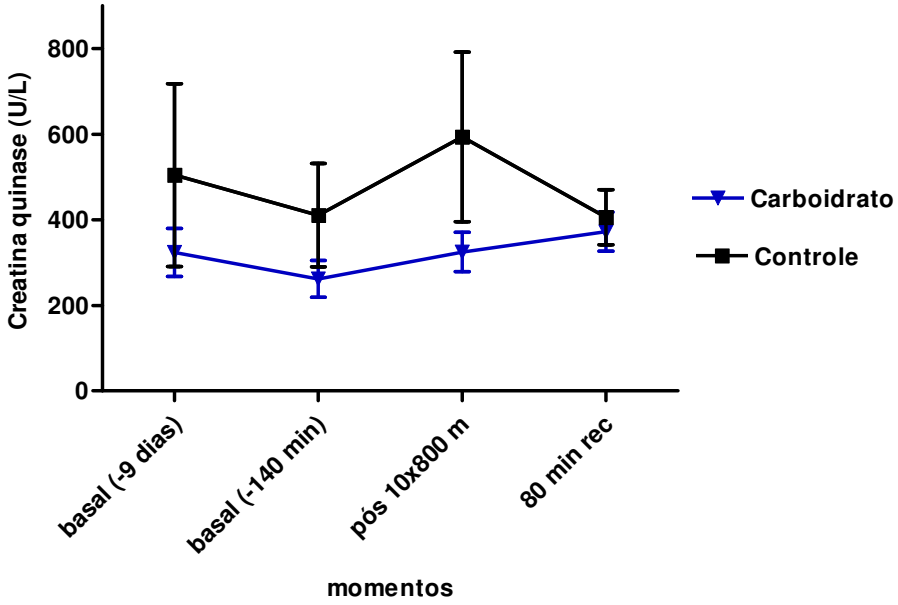


Figura 21. Concentração sérica de creatina quinase (CK) (Média±EPM) em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo.

5.7.3 Resposta cortisolêmica e sua correlação com marcadores de dano tecidual

As inter-relações entre o cortisol e os marcadores de lesão estão apresentados na figura 22. Os valores de cortisol foram correlacionados significativamente com a concentração de DNA livre e de LDH e com a contagem de leucócitos, mas não com a concentração de CK ($r<0,40$, $p>0,05$).

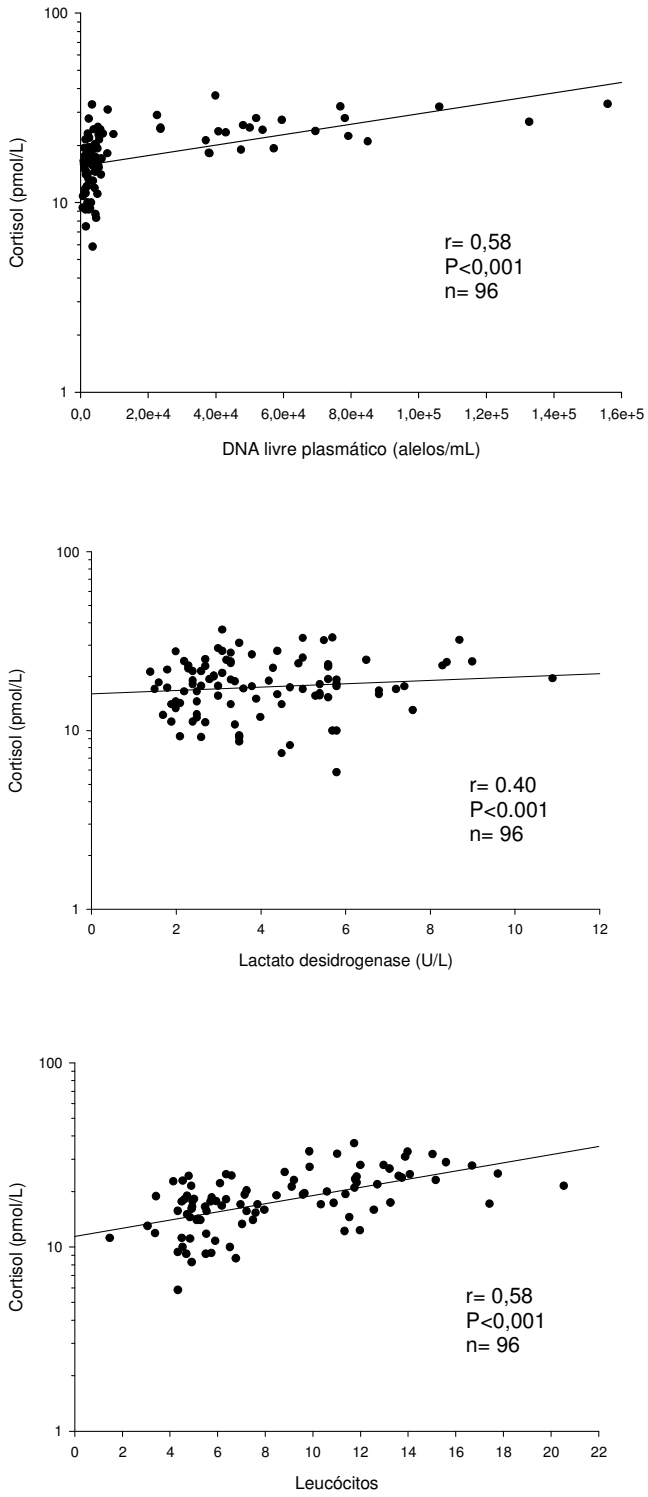


Figura 22. Correlações entre as variáveis concentrações de DNA livre e de lactato desidrogenase e contagem de leucócitos vs. concentração de cortisol em corredores competitivos suplementados com carboidratos durante treinamento intensivo.

5.8 Percepção do estado de humor

Após o período de treinamento intensivo, houve aumento do *score* de fadiga em ambos os grupos (figura 23), sendo essa diferença maior no grupo CON ($p<0,01$) em relação ao grupo CHO ($p<0,05$). Os *scores* de vigor diminuíram apenas no grupo CON após o período de treinamento ($p<0,01$). Não houve mudança significativa da percepção global de humor dos atletas em ambos os grupos ao longo do estudo (figura 23).

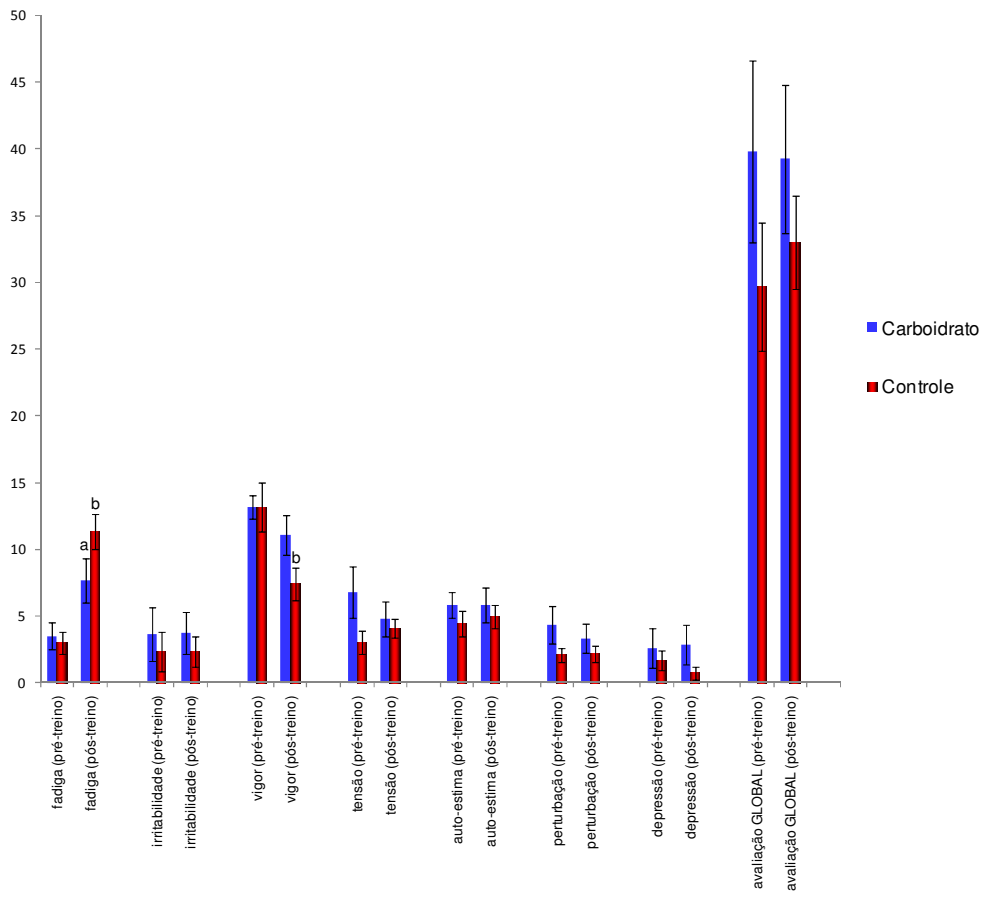


Figura 23. *Scores* do estado de humor (Média±EPM) dos corredores suplementados com carboidratos antes e após treinamento intensivo. a: diferença quando comparada ao momento pré (-9 dias) ($p<0,05$), b: diferença quando comparada ao momento pré (-9 dias) ($p<0,01$)

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos os efeitos de um microciclo de treinamento intensivo, associado ou não à suplementação com carboidratos sobre as respostas metabólicas e hormonais, estoques de triacilglicerol intramuscular e marcadores de lesão tecidual. Além disso, após esse período de treinamento, buscou-se avaliar o impacto desses procedimentos sobre parâmetros metabólicos, hormonais, imunológicos, de lesão tecidual, psicológicos, cardiovasculares, perceptuais e de desempenho físico antes, durante e após um protocolo de exercícios intermitentes de alta intensidade com ou sem suplementação de CHO.

Os dados biométricos, as características de *perfomance*, o volume de treinamento e a ingestão energética apresentados pelos corredores de ambos os grupos os classificam como atletas de alto rendimento.

As sessões de exercícios foram realizadas na velocidade correspondente à Vm_{3km}, parâmetro associado ao VO_{2max} (Hill e Rowell, 1996; Grant *et al.,* 1997; Simões *et al.,* 2005), o que pode ser confirmado pelas respostas da frequência cardíaca e da percepção subjetiva ao esforço observadas durante as séries de corrida do presente estudo, realizadas próximas da Vm_{3Km}.

Todas as variáveis hormonais da 1ª coleta basal (-9 dias) foram similares entre os grupos. Entretanto, após 8 dias de treinamento intensivo, as concentrações basais (-140 min) de testosterona e de sua fração livre

foram significativamente maiores no grupo CHO. Isso provavelmente se deve à menor supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal, evidenciado pela maior concentração do hormônio LH no grupo CHO, o que pode ter favorecido a resposta anabólica neste grupo. A redução do hormônio testosterona é um dos efeitos primários do *overtraining* em homens (Wade *et al.,* 2005) e a manipulação dietética adotada pode ter atenuado o aparecimento dos sintomas associados a essa síndrome, que frequentemente compromete a carreira do atleta.

Segundo Keizer *et al.* (1989) e Dressendorfer, Wade (1991) a redução na concentração basal de testosterona pode ocorrer em atletas de *endurance,* após programa de treinamento prolongado. Neste estudo, é possível que a suplementação com carboidratos durante os treinos tenha contribuído na atenuação do estresse pós-exercício, propiciando aumento da concentração de testosterona após 8 dias de treinamento intenso (-140 min).

Dessa forma, a intervenção nutricional adotada para os grupos durante 8 dias de treinamento foi efetiva em preservar os parâmetros metabólicos e hormonais, indicando atenuação do estresse metabólico. Tais achados corroboram os estudos de Isley *et al*. (1984), Ormsbee *et al*. (2006) e Alemany *et al.* (2008), indicando que os hormônios testosterona, IGF-1 e IGFBP-3 são mantidos em concentrações fisiológicas normais quando a ingestão energética está adequada em comparação a dietas restritas em energia e proteínas. Os corredores de ambos os grupos desta investigação apresentaram ingestão energética similar, sendo essa condição também

relacionada à manutenção dos níveis de IGFBP-3 dos atletas de elite do estudo de Elloumi *et al*. (2005).

Os sintomas de *overreaching* são caracterizados como sendo a fase inicial da síndrome de *overtraining,* que acomete atletas durante regime de treinamento intenso com inadequado período de descanso, resultando em queda da habilidade de treinar e no nível de *performance* física. Tais disfunções podem ser controladas através da monitorização do estado catabólico, pelas relações dos hormônios testosterona/cortisol e IGF-1/IGFBP-3 (Elloumi *et al.,* 2005; Banfi e Dolce, 2006). Ao se comparar os valores basais dessas relações em ambos os grupos, nenhuma diferença significativa foi encontrada. Entretanto, após o exercício (9º dia), a relação IGF-1/IGFBP-3 aumentou com a suplementação com CHO e a queda da relação testoterona/ cortisol ocorreu tardiamente nesse grupo, indicando menor estresse catabólico.

Embora a concentração de IGF-1 após treinamento intensivo estivesse maior no grupo CON em comparação ao grupo CHO, essa diferença não foi evidente na relação IGF-1/ IGFBP-3.

A diminuição da relação testosterona/cortisol foi marcador de cansaço acumulado, no estudo de Maso *et al.* (2004). Assim, a maior concentração de testosterona após 8 dias de treinamento intenso, bem como a menor resposta do cortisol no grupo CHO, possivelmente contribuíram na atenuação do catabolismo. Estes dados sugerem que a suplementação com CHO pode trazer benefícios para o organismo dos atletas, como recuperação das microlesões pós-exercício, modulação da resposta

imunológica, melhora da saúde óssea e muscular, atenuação da resposta do sistema endócrino ao estresse e prevenção dos sintomas associados ao *overtraining,* melhorando sua *performance* e reduzindo danos.

O estresse metabólico induzido pelo modelo de exercício utilizado também foi confirmado pelas respostas cardiovasculares, perceptuais, glicêmicas, lactatêmicas e adrenérgicas.

No grupo suplementado com CHO foi observado aumento da glicemia a partir da sessão de exercícios intermitentes até os 80 min de recuperação. Tal manipulação provavelmente aumentou a disponibilidade de substrato (glicose exógena), favorecendo o estímulo da glicólise e a menor utilização dos estoques de glicogênio. Os resultados do estudo de Sousa *et al.* (2007) são semelhantes aos encontrados no presente trabalho, indicando maior atividade glicolítica e menor utilização dos estoques de glicogênio no grupo suplementado.

O aumento da glicemia no grupo CHO após a sessão de corrida intermitente foi acompanhado de menor concentração do cortisol, o que pode ter favorecido menor depleção das proteínas musculares. Além dessas respostas, o aumento da insulinemia pós-exercício no grupo CHO pode ter contribuído em menor utilização dos substratos energéticos hepáticos. Esta condição anabólica pode ter favorecido o aumento da síntese de glicogênio durante os intervalos para descanso entre as sessões de corrida no grupo CHO. A concentração elevada dos hormônios cortisol e epinefrina no grupo CON possivelmente contribuiu para a manutenção da glicemia durante a sessão de exercício intermitente.

No entanto, alguns estudos que investigaram os efeitos da suplementação aguda com carboidratos em exercícios intermitentes de alta intensidade não observaram redução na resposta cortisolêmica (Bishop *et al.,* 1999; de Sousa *et al.,* 2007). O fato de termos feito suplementação com CHO por tempo prolongado possivelmente explique a diferença significativa entre os grupos.

No questionário de avaliação do estado de humor, a manutenção da percepção de vigor dos atletas do grupo CHO corrobora as respostas fisiológicas e de desempenho físico supracitadas. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Achten *et al.* (2004), que avaliaram os efeitos da dieta rica em CHO em corredores durante treinamento intensivo.

No que se refere à utilização das gorduras, a suplementação com CHO se mostrou efetiva em aumentar os estoques de LI mesmo após vários dias de treinamento intenso. Segundo van Loon (2004), o LI é um importante substrato energético para o exercício de *endurance* e pode contribuir para preservação dos estoques de glicogênio. O aumento da insulinemia após o exercício, pode ter favorecido o incremento desses estoques. Isso se deve tanto à insulina como à contração muscular, que favorecem a captação de ácidos graxos no músculo via translocação do transportador de gordura CD36 (FAT/CD36) do citoplasma para o sarcoplasma, sendo esses subtratos carreados para dentro dos miócitos (Johnson *et al.,* 2004). Entretanto, alguns estudos não identificaram aumentos significativos na concentração de LI com dietas abundantes em CHO (60-83% do valor energético diário). Decombaz *et al.* (2001) observaram aumento

insignificante de 7% da quantidade de LI, enquanto que no estudo de Kiens e Richter (1998), foi identificada redução de 10% dos estoques intracelulares. Novamente, o tempo de administração da dieta desses estudos, que durou de 3-30 h, pode ter influenciado nas baixas/ ou inalteradas concentrações de LI, ao contrário deste, no qual os atletas foram suplementados durante 9 dias, fato que pode ter contribuído no aumento do LI.

Paralelamente, na sessão de corrida intermitente, as baixas concentrações de ácidos graxos livres (AGL) durante e após o exercício observadas no grupo CHO indicam supressão lipolítica (Angus *et al.*, 2000; Febbraio *et al.*, 2000). Durante o exercício intenso (>65% VO_{2max}), a estimulação da glicogenólise aumenta o fluxo glicolítico e a taxa de aparecimento dos ácidos graxos diminui significativamente devido ao menor fluxo sanguíneo no tecido adiposo (Wolfe 1998; Jeukendrup *et al.*, 1998, 1999). Ressaltando que no grupo CHO, a elevação da insulinemia, e a menor concentração do hormônio GH pós-exercício, possivelmente contribuiram para estes resultados e para o aumento do LI.

No que diz respeito aos marcadores de dano tecidual, nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, que a suplementação com CHO atenuou o aumento das concentrações de DNA livre plasmático pós-exercício. Da mesma forma, a ingestão de CHO resultou em menor elevação das concentrações de LDH e do número de leucócitos e monócitos circulantes pós-exercício. A menor resposta cortisolêmica com a suplementação de CHO pode ter minimizado os danos teciduas pós-exercício, seja pela

atenuação do aumento da leucocitose, ou pela redução da mobilização desses leucócitos para reparo do tecido lesionado, contribuindo na diminuição do processo inflamatório.

Semelhante aos estudos anteriores (Suzuki *et al.,* 1999; Gleeson 2007; Bessa *et al.,* 2008), a leucocitose induzida pelo exercício também foi demonstrada neste estudo. A contagem de leucócitos aumentou 2,0 vezes no grupo CON e de 1,7 vezes no grupo CHO. A menor resposta dessas células pós-exercício no grupo CHO também está de acordo com vários trabalhos (Mitchell *et al.,* 1998; Scharhag *et al.,* 2006; Gleeson, 2007).

As interações entre parâmetros de dano tecidual e hormônio de estresse, foram observadas nas correlações positivas entre a resposta cortisolêmica com as concentrações de DNA livre, contagem de leucócitos e LDH. Tais associações sugerem que o aumento deste hormônio do estresse durante o exercício pode afetar a resposta inflamatória, bem como a propagação de lesão muscular.

As concentrações de LDH, conhecido marcador bioquímico de lesão muscular, aumentaram apenas no grupo CON, após o programa de treinamento e após as 10x800m, em paralelo com os níveis de DNA livre, fornecendo maior respaldo à interpretação de que a suplementação com CHO pode proteger contra danos teciduais.

No presente estudo não foi observado diferença nos índices de aminotransferases entre os grupos CHO e CON durante o 9º dia. Embora as concentrações de AST fossem maiores no grupo CHO no início (-9 dias), antes do protocolo de pesquisa, essa diferença desapareceu no decorrer do

estudo. Segundo Bessa *et al.* (2008) e Bassini Cameron *et al.* (2007), o aumento das aminotransferases durante o exercício pode ser associado com danos hepáticos.

Neste estudo, não houve aumento dos valores de CK nos dois grupos.

Como observado em outros estudos (Chen *et al.,* 2001; Saunders *et al.,* 2004), os valores de CK são altamente variáveis, com coeficientes de variação de 200% ou mais. Dados com essa variabilidade podem resultar em diminuição do poder estatístico, o que pode ter prejudicado a análise entre grupos e a correlação com os valores de cortisol.

Também, o fato do aumento da concentração de CK ser mais tardio (após 24 h de exercício) pode justificar os nossos achados (Overgaard *et al.* 2004, Tsai *et al.* 2001).

Quanto ao DNA livre plasmático, os mecanismos envolvidos no aumento desse marcador durante o exercício intenso podem ser multifatoriais.

Supõe-se que o DNA livre é encontrado no plasma após a lise celular, sendo este oriundo de lesões teciduais e fragmentação das células sanguíneas circulantes (Stroun *et al.,* 2001). Conforme demonstrado por Tsai *et al.* (2001), o exercício pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no compartimento vascular devido às lesões miofibrilares, que promovem a infiltração de células inflamatórias. Assim, as EROs produzidas desse modo podem permear nos leucócitos periféricos e levar à fragmentação do ácido nucléico. Além do ataque direto do DNA pelas

EROs, os vários produtos de peroxidação lipídica também podem interagir com o DNA e causar oxidação dos nucleotídeos (Tsai *et al.* 2001).

Além disso, os três principais hormônios de estresse (noradrenalina, cortisol e adrenalina) podem afetar tanto as células imunes quanto as não-imunes (Dhabhar e McEwen, 1999). No estudo realizado com cultura de células, Flint *et al.* (2007) mostrou que a exposição a curto prazo (<30 min) ao cortisol, à noradrenalina ou à adrenalina aumentou de cinco vezes ou mais os danos no DNA nas células tratadas, em relação às controles.

Finalizando, os achados deste estudo enfatizam a necessidade de suplementação com CHO em atletas de alto rendimento durante treinos intervalados e contínuos de alta intensidade com duração inferior a 1 hora, característico da fase de *sobrecarga de treinamento (overload training)*. Dessa forma, consideramos imprescindível a presença de nutricionistas em equipes esportivas para monitorização do consumo alimentar e para ações educativas, envolvendo temas relacionados às ciências do exercício como nutrição, bioquímica e fisiologia, visando maior aderência ao consumo de carboidratos, que ainda são discriminados entre corredores e atletas de várias modalidades esportivas.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A suplementação com CHO durante um microciclo de treinamento intensivo atenuou a supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal, aumentando as concentrações de testosterona total e de sua fração livre.

A suplementação com CHO, resultou em menor resposta cortisolêmica, em melhoria das relações testosterona/cortisol e IGF-1/IGFBP-3, supressão lipolítica e aumento dos estoques de lipídios intramiocelulares favorecendo maior reserva energética aos corredores.

Contribui para reduções significativas da inflamação (< leucocitose) e de lesão celular, evidenciadas pelas menores concentrações de DNA livre e da LDH proporcionando melhor recuperação durante o treinamento intensivo.

Tais alterações, associadas à atenuação do catabolismo, foram acompanhadas de melhora da *performance* atlética dos corredores e da recuperação durante o treinamento intensivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achten J, Halson SL, Moseley L, Rayson MP, Casey A, Jeukendrup AE. Higher dietary carbohydrate content during intensified running training results in better maintenance of performance and mood state. *J Appl Physiol.* 2004; 96:1331-1340.

Alemany JA, Nindl BC, Kellogg MD, Tharion WJ, Young AJ, Montain SJ. Effects of dietary protein content on IGF-I, testosterone, and body composition during 8 days of severe energy deficit and arduous physical activity. *J Appl Physiol.* 2008; 105: 58 -64.

Angeli A, Minetto M, Dovio A, Paccotti P. The overtraining syndrome in athletes: A stress-related disorder. *J Endocrinol Invest.* 2004; 27: 603-612.

American College of Sports Medicine (ACSM). Nutrition and Athletic Performance. *J Am Diet Assoc.* 2009; 109: 509-527.

Andrews JL, Sedlock DA, Flynn MG, Navalta JW, Hongguang J. Carbohydrate loading and supplementation in endurance-trained women runners. *J Appl Physiol.* 2003; 95: 584-590.

Angus DJ, Hargreaves M, Dancey J, Febbraio MA. Effect of carbohydrate or carbohydrate plus medium-chain triglyceride ingestion on cyclists time trial performance. *J Appl Physiol.* 2000; 88:113-119.

Banfi G, Marinelli M, Roi GS, Agape V. Usefulness of free testosterone/ cortisol ratio during season of elite speed skating athletes. *Int J Sports Med.* 1993; 14: 373-9.

Banfi G, Dolci A. Free testosterone/cortisol ratio in soccer: usefulness of a categorization of values. *J Sports Med Phys Fitness.* 2006; 46: 611-6.

Belmonte MA, Aoki MS. Triacilglicerol intramuscular: um importante substrato energético para o exercício de *endurance. Rev Bras Med Esporte.* 2005; 11: 135-140.

Bessa A, Nissenbaum M, Monteiro A, Gandra PG, Nunes LS, Bassini-Cameron A, Werneck-de-Castro JPS, de Macedo DV, Cameron LC. High-intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. *Br J Sports Med.* 2008; 42: 889-893.

Bishop NC, Blannin AK, Robson PJ, Walsh NP, Gleeson M. The effects of carbohydrate supplementation on immune responses to a soccer-specific exercise protocol. *J Sports Sci.* 1999; 17:787-796.

Bompa TO. *Periodization - Theory and Methodology of Training.* 4th ed. Champaign IL: Human Kinetics; 1999. p. 350.

Borg G. *Escalas de Borg para a dor e o esforço percebido.* São Paulo: Editora Manole; 2000. p. 115.

Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull.* 2007; 81 e 82: 209-230.

Brenner J, Shek PN, Zamecnik J, Shepard RJ. Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med.* 1998; 19: 130-43.

Chen TC, Hsieh SS. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33: 1732-38.

Close GL, Ashton T, Cable T, Doran D, Noyes C, McArdle F, MacLaren DPM. Effects of dietary carbohydrate on delayed onset muscle soreness and reactive. *Br J Sports Med.* 2005; 39: 948-953.

Cokker R H, Kjaer M. Glucoregulation during exercise- The role of the neuroendocrine system. *Sports Med.* 2005; 35; 575-583.

Costa LOP, Samulski DM. Overtraining em atletas de alto nível – Uma revisão literária. *R Bras Cie Mov.* 2005; 13: 123-134.

Costill DL, Flynn MG, Kirwan JP, Houmard JA, Mitchell JB, Thomas R, Park SH. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med Sci Sports Exerc.* 1988; 20:249-254.

Costill DL, Bowers R, Branam G, Sparks K. Muscle glycogen utilization during prolonged exercise on successive days. *J Appl Physiol.* 1971; 31: 834-838.

Decombaz J, Schmitt B, Ith M, Decarli B, Diem P, Kreis R, Hoppeler H, Boesch C. Postexercise fat intake repletes intramyocellular lipids but no faster in trained than in sedentary subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281: R760-9.

de Sousa M V, Simões H G, Oshiiwa M, Rogero M R, Tirapegui J. Effects of acute carbohydrate supplementation during sessions of high-intensity intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2007; 99: 57-63.

Dressendorfer RH, Wade CE. Effects of a 15-d race on plasma steroid levels and leg muscle fitness in runners. *Med Sci Sports Exerc.* 1991; 23: 954-8.

Elliot B. *Training in Sport. Applying Sport Science.* England: John Wiley & Sons; 1998. p. 351-402.

Elloumi M, Elj N El, Zaouali M, Maso F, Filaire E, Tabka Z, Lac G. IGFBP-3, a sensitive marker of physical training and overtraining. *Br J Sports Med.* 2005; 39: 604-610.

Fatouros IG, Destouni A, Margonis K, Jamurtas, AZ, Vrettou C, Kouretas D, Mastorakos G, Mitrakou A, Taxildaris K, Kanavakis E, Papassotiriou I. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clinical Chemistry.* 2006; 52: 1820-2.

Febbraio MA, Chiu A, Angus DJ, Arkinstall MJ, Hawley JA. Effects of carbohydrate ingestion before and during exercise on glicose kinetics and performance. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2220-2226.

Fueger P T, Hess H S, Posey K A, Bracy D P, Pencek R R, Charron M J, Wasserman D H. Control of exercise-stimulated muscle glucose uptake by GLUT 4 is dependent on glucose phosphorylation capacity in the conscious mouse. *J Biol Chem.* 279: 50956-50961, 2004.

Fujii N, Jessen N, Goodyear L J. AMP-activated protein kinase and the regulation of glicose transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291: E867-877.

Gleeson M, Bishop NC. Elite athlete immunology: Importance of nutrition. *Int J Sport Med.* 2000; 21: 44S-50S.

Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol.* 2007; 103: 693- 699.

Grant S, Craig I, Wilson J, Aitchison T. The relationship between 3 km running performance and selected physiological variables. *J Sports Sci.* 1997; 15: 403-410.

Grove R J, Prapavessis H. Preliminary evidence for the reliability and validity of an abbreviated Profile of Mood States. *Int J Sport Psychol.* 1992; 23: 93-109.

Halson S L; Jeukendrup A E. Does Overtraining Exist? *Sports Med*. 2004; 34: 967-981.

Hargreaves M. *Exercise metabolism*. Champaign: Human Kinetics, 1995. p.41-72.

Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle. *Physiology.* 2006; 21: 48–60.

Hawley JA, Hopkins WG. Aerobic Glycolitic and Aerobic Lipolytic Powers Systems. *Sports Med.* 1995; 19:240-250.

Hill DW, Rowell AL. Running velocity at VO_2max. *Med Sci Sports Exerc.* 1996; 28: 114-119.

Howlett K, Febbraio M, Hargraves M. Glicose production during strenuous exercise in humans: role of epinephrine. *Am J Physiol.: Endocrinol. Metab.* 1999; 276: E1130-E1135.

Inyard A C, Clerk L H, Vincent M A, Barret E J. Contraction stimulates nitric oxide independent microvascular recruitment and increases muscle insulin uptake. *Diabetes* 2007; 56: 2194-2200.

Isley WL, Underwood LE, Clemmons DR. Changes in plasma somatomedin-C in response to ingestion of diets with variable protein and energy content. *J Parenter Enteral Nutr.* 1984; 8: 407-11.

Ivy JL. Glycogen resynthesis after exercise: effect of carbohydrate intake. *Int J Sport Med.* 1998; 19:142S-146S.

Jacobs KA, Sherman WM. The efficacy of carbohydrate supplementation and chronic high-carbohydrate diets for improving endurance performance. *Int J Sport Nutr.* 1999; 9: 92-115.

Jeukendrup AE, Wagenmakers AJM, Stegen JHCH, Gijsen AP, Brouns F, Saris WHM. Carbohydrate ingestion can completely suppress endogenous glicose production during exercise. *Am J Physiol: Endocrinol Metab.* 1999; 276: E672-E683.

Johnson NA, Stannard SR, Thompson MW. Muscle triglyceride and glycogen in endurance exercise – implications for performance. *Sports Med.* 2004; 34: 151-164.

Judelson DA, Maresh CM, Yamamoto LM, Farrell MJ, Armstrong LE, Kraemer WJ, Volek JS, Spiering BA, Casa DJ, Anderson JM. Effect of hydration state on resistance exercise-induced endocrine markers of anabolism, catabolism, and metabolism. *J Appl Physiol.* 2008; 105: 816-824.

Haff GG, Lehmkuhl MJ, Mccoy LB, Stone MH. Carbohydrate supplementation and resistance training. *J Strength Cond Res.* 2003; 17: 187-196.

Hargreaves M. *Exercise metabolism*. Champaign: Human Kinetics, 1995. p.41-72.

Hawley JA, Hopkins WG. Aerobic Glycolitic and Aerobic Lipolytic Powers Systems. *Sports Med.* 1995; 19: 240-250.

Keizer H, Janssen GM, Menheere P, Kranenburg G. Changes in basal testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone sulfate in previously untrained males and females preparing for a marathon. *Int J Sports Med.* 1989; 10: S139-45.

Kenttä G, Hassmén P. Overtraining and Recovery. *Sports Med* 1998; 26: 1-16.

Kiens B, Richter E A. Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in humans. *Am J Physiol.* 1998; 275: E332-7.

Kiens B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev* 2006; 86: 205-243.

Kirwan JP, Costill DL, Mitchell JB, Houmard JA, Flynn MG, Fink WJ, Beltz JD. Carbohydrate balance in competitive runners during successive days of intense training. *J Appl Physiol.* 1988; 65: 2601-06.

Howlett K, Febbraio M, Hargraves M. Glucose production during strenuous exercise in humans: role of epinephrine. *Am J Physiol: Endocrinol Metab.* 1999; 276: E1130-E1135.

Kraemer WJ, Volek JS, Bush JA, Putukian M, Sebastianelli WJ. Hormonal responses to consecutive days of heavy-resistance exercise with or without nutritional supplementation. *J Appl Physiol.* 1998; 85: 1544-1555.

Kraemer WJ, Fragala MS, Watson G, Volek JS, Rubin MR, French DN, Maresh CM, Vingren JL, Hatfield DL, Spiering BA, Yu-Ho J, Hughes SL, Case HS, Stuempfle KJ, Lehmann DR, Bailey S, Evans DS. Hormonal responses to a 160-km race across frozen Alaska. *Br J Sports Med.* 2008; 42: 116-120.

Kraniou GN, Cameron-Smith D, Hargreaves M. Acute exercise and GLUT-4 expression in human skeletal muscle: influence of exercise intensity. *J Appl Physiol*. 2006; 101: 934-937.

Kristiansen S, Gade J, Wojtaszewski J F, Kiens B, Richter E A. Glucose uptake is increased in trained vs.. Untrained muscle during heavy exercise. *J Appl Physiol.* 2000; 89: 1151-1158.

Lucia A, Diaz B, Hoyos J, Fernández C, Villa G, Bandrés F, Chicharro JL. Hormonal levels of world class cyclists during the Tour of Spain stage race. *Br J Sports Med.* 2001; 35: 424-30.

MacLean PS, Zheng D, Dohm GL. Muscle glicose transporter (GLUT 4) gene expression during exercise. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2000; 28: 148-152.

Marliss EB, Vranic M. Intense exercise has unique effects on both insulin release and its roles in glucoregulation. *Diabetes.* 2002; 51: 271S-283S.

Maso F, Lac G, Filaire E, Michaux O, Robert A. Salivary testosterone and cortisol in rugby players: correlation with psychological overtraining itens. *Br J Sports Med* 2004; 38: 260-263.

McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Fisiologia do exercício*: energia, nutrição e desempenho humano. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.68-74.

McKenzie DC. Markers of Excessive Exercise. *Can J Appl Physiol*. 1999; 24: 66-73.

Mitchell JB, Pizza FX, Paquet A, Davis BJ, Forrest MB, Braun WA. Influence of carbohydrate status on immune responses before and after endurance exercise**.** *J Appl Physiol.* 84: 1917-1925, 1998.

Mougios V. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. *Br J Sports Med.* 2007; 41- 674-78

O'Brien MJ, Viguie CA, Mazzeo RS, Brooks GA. Carbohydrates dependence during marathon running. *Med Sci Sports Exerc*. 1993; 25:1009-1017.

Ormsbee M, Clapper JA, Clapper J, Vukovich MD. Moderate changes in energy balance combined with exercise do not alter insulin-like growth factor I or insulin-like growth factor binding protein-3. *Nutr Res.* 2006; 26: 467-473.

Overgaard K, Fredsted A, Hyldal A, Ingemann-Hansen T, Gissel H, Clausen T. Effects of running distance and training on Ca2+ content and damage in human muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36: 821-829.

Riegel RE. *Bioquímica nutricional do exercício físico.* Rio Grande do Sul: UNISINOS; 2005. p. 61.

Rogero MM, Tirapegui J. Nutritional aspects of glutamine and physical activity. *J. Brazilian Soc. Food Nutr.* 2003; 25: 99-124.

Romano-Ely BC, Todd MK, Saunders MJ, Laurent TS. Effect of an isocaloric carbohydrate-protein-antioxidant drink on cycling performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38: 1608-16.

Rose A J, Richter E A. Skeletal muscle glicose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiol.* 2005; 20: 260-270.

Rotman S, Slotboom J, Kreis R, Boesch C, Jequier E. Muscle glycogen recovery after exercise measured by 13 C- magnetic resonance spectroscopy in humans: effect of nutritional solutions. *Magma.* 2000; 11: 114-121.

Rottman J N, Bracy D, Malabanan C, Yue Z, Clanton J, Wasserman D H. Contrasting effects of exercise and NOS inhibition on tissue-specific fatty acid and glucose uptake in mice. AM J Physiol Endocrinol Metab 283: E 116-E123, 2002.

Saunders MJ, Kane MD, Todd, MK. Effects of a Carbohydrate-Protein Beverage on Cycling Endurance and Muscle Damage. *Med Sci Sports Exerc* 36: 1233–38, 2004.

Scharhag J, Meyer T, Auracher M, Gabriel HH, Kindermann W. Effects of graded carbohydrate supplementation on the immune response in cycling. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38: 286-92.

Sigal RJ, Purdon C, Bilinski D, Vranic M, Halter JB, Marliss EB. Glucoregulation during and after intense exercise: effects of β–blockade. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78: 359-366.

Simões HG, Marcon F, Oliveira F, Campbell CSG, Baldissera V, Costa Rosa LFBP. Resposta da razão testosterona/cortisol durante o treinamento de corredores velocistas e fundistas. *Brazilian J Physical Educ.* 2004; 18: 31-46.

Simões HG, Campbell CG, Kushnick MR, Nakamura A, Katsanos C, Baldissera V, Moffatt RJ. Blood Glicose Threshold and the metabolic

responses to incremental exercise tests with and without prior lactic acidosis induction. *Eur J Applied Physiol.* 2003; 89: 603-611.

Simões HG, Denadai BS, Baldissera V, Hill DW, Campbell CSG. Relationships and significance of lactate minimum, critical velocity, heart rate deflection and 3000m track-tests for running. *J Sports Med Phys Fitness.* 2005; 42: 441-451.

Smith DJ, Norris SR. Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32: 684–689.

Smith L L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000; 32: 317-31.

Sousa M V, Tirapegui J. Do athletes fill their nutritional carbohydrate needs when going on diets? *J Brazilian Soc Food Nutr.* 2005; 29: 121-140.

Steffensen CH, Roepstorff C, Madsen M, Kiens B. Myocellular triacylglycerol breakdow in females but not in males during exercise. *Am J Physiol Endocrionol Metab.* 2002; 282: E634-642.

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta.* 2001; 313: 139–142.

Stryer L. *Bioquímica*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1996. p. 729 – 747.

Su Q, Tian Y, Zhang JG, Zhang H. Effects of allicin supplementation on plasma markers of exercise-induced muscle damage, IL-6 and antoxidant capacity. *Eur J Appl Physiol.* 2008; 103: 275-283.

Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, Yamada M, Kudoh S, Liu Q, Sugawara K, Yamaya K, Sato K. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol.* 1999; 87: 1360-67.

Szczepaniak L S, Babcock E E, Schick F, Dobbins R L, Garg A, Burns D K, Mcgarry J D, Stein D T. Measurement of intracellular triglyceride stores by 1H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol* 1999; 39: E977 – 989.

TACO. *Tabela brasileira de composição de alimentos.* 2ª. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006.

Tirapegui J. *Nutrição, Metabolismo e Suplementação na Atividade Física.* São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p. 213.

Totsuka M, Nakaji S, Suzuki K, Sugawara K, Sato K. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. *J Appl Physiol.* 2002; 93: 1280-86.

Tremblay MS, Copeland JL, Helder WV. Effect of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men. *J Appl Physiol.* 2004; 96: 531-39.

Tsai K, Hsu T, Hsu K, Cheng H, Liu T, Hsu C, Kong C. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 1465-72.

Tsintzas K, Williams C. Human muscle glycogen metabolism during exercise. *Sports Med.* 1998; 25:7-23.

Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med.* 1995; 20:251-276.

van Loon LJC. Use of intramucular triacylglycerol as a substrate source during execise in humans. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 1170-1187.

Wade CE, Stanford KI, Stein TP, Greenleaf JE. Intensive exercise training suppresses testosterone during bed rest. *J Appl Physiol.* 2005; 99: 59-63.

Wallis GA, Hulston CJ, Mann CH, Roper HP, Tipton KD, Jeukendrup AE. Postexercise muscle glygogen synthesis wih combined glicose and frutose ingestion. *Med Sci Sports Exerc.* 2008; 40: 1789-94.

Wasserman DH. Four grams of glicose. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E11-E21.

Welsh RS, Davis JM, Burke JR, Williams HG. Carbohydrate and physical/mental performance during intermittent exercise to fatigue. *Med Sci Sports Exerc.* 2002; 34: 723-731.

Williams MH. *Nutrição para saúde, condicionamento físico e desempenho esportivo.* 5ª ed. São Paulo: Manole; 2002.

Wilmore JH, Costill DL. *Fisiologia do esporte e do exercício*. 2ª ed. São Paulo: Manole, 2001. p.709.

Wojtaszewski JFP, Nielsen JN, Richter EA. Exercise effects on muscle insulin signaling and action invited review: effect of acute exercise on insulin signaling and action in humans. *J Appl Physiol.* 2002; 93: 384-392.

Wolfe RR. Metabolic interactions between glicose and fatty acids in human. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67: p519S-526S.

Wouassi D, Mercier J, Ahmaidi S, Brun JF, Mercier B, Orsetti A, Préfaut CH. Metabolic and hormonal responses during repeated bouts of brief and intense exercise: effects of pre-exercise glicose ingestion. *Eur J Appl Physiol.* 1997; 76: 197-202.

ANEXO

Eur J Appl Physiol (2010) 109:507–516
DOI 10.1007/s00421-010-1388-8

ORIGINAL ARTICLE

Effects of carbohydrate supplementation on competitive runners undergoing overload training followed by a session of intermittent exercise

Maysa Vieira de Sousa · Klavs Madsen · Herbert Gustavo Simões · Rosa Maria Rodrigues Pereira · Carlos Eduardo Negrão · Ronaldo Zucatelli Mendonça · Liliam Takayama · Rosa Fukui · Maria Elizabeth Rossi da Silva

Accepted: 31 January 2010 / Published online: 19 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract This study evaluated the effects of a micro cycle of overload training (1st–8th day) on metabolic and hormonal responses in male runners with or without carbohydrate supplementation and investigated the cumulative effects of this period on a session of intermittent high-intensity running and maximum-performance-test (9th day). The participants were 24 male runners divided into two groups, receiving 61% of their energy intake as CHO (carbohydrate-group) and 54% in the control-group (CON). The testosterone was higher for the CHO than the CON group after the overload training (694.0 ± 54.6 vs. CON 610.8 ± 47.9 pmol/l). On the ninth day participants performed 10 × 800 m at mean 3 km velocity. An all-out 1000 m running was performed before and after the 10 × 800 m. Before, during, and after this protocol, the runners received solution containing CHO or the CON equivalent. The performance on 800 m series did not differ in either group between the first and last series of 800 m, but for the all-out 1000 m test the performance decrement was lower for CHO group (5.3 ± 1.0 vs. 10.6 ± 1.3%). The cortisol concentrations were lower in the CHO group in relation to CON group (22.4 ± 0.9 vs. 27.6 ± 1.4 pmol/l) and the IGF1/IGFBP3 ratio increased 12.7% in the CHO group. During recovery, blood glucose concentrations remained higher in the CHO group in comparison with the CON group. It was concluded that CHO supplementation possibly attenuated the suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and resulted in less catabolic stress, and thus improved running performance.

Keywords Carbohydrate supplementation · Overload training · Testosterone · Cortisol · Intermittent exercise · IGF1

Communicated by Susan Ward.

M. V. de Sousa (✉) · R. Fukui · M. E. R. da Silva
Laboratory of Medical Investigation LIM-18,
Faculty of Medicine, University of São Paulo,
Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, Sala 3324,
São Paulo 01246-000, SP, Brazil
e-mail: maysavs@uol.com.br

K. Madsen
Department of Sport Science, University of Aarhus,
Aarhus, Denmark

H. G. Simões
Laboratory of Physical Evaluation and Training,
Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

R. M. R. Pereira · L. Takayama
Rheumatology Division, Faculty of Medicine,
University of São Paulo,
São Paulo, SP, Brazil

C. E. Negrão
Heart Institute (InCor), Faculty of Medicine,
University of São Paulo,
São Paulo, SP, Brazil

R. Z. Mendonça
Laboratory of Viral Immunology,
University of São Paulo, SP, Brazil

Introduction

For athletes, a micro cycle of training (e.g. 5–10 days) during which they undergo periods of more intense training is described as an overload period. The aim of such a regimen is to maximize the improvement in athletic performance during subsequent periods of recovery in which the amount of training is reduced (Achten et al. 2004).

Unfortunately, there is a fine line between improving physical performance and sustaining injuries, and there is a

known link between intensive training followed by inadequate recovery periods and overtraining syndrome, which can result in athletic performance deterioration. Overtraining syndrome affects approximately 65% of long-distance runners at some point in their career (McKenzie 1999).

Overtraining syndrome has been associated, on a physiological level, with an increased activity of both sympathetic nervous system and the hypothalamus–pituitary–adrenal axis during periods of resting. In addition, studies have shown suppression of the hypothalamic-pituitary–gonadal and immunosuppression (Banfi et al. 1993; Brenner et al. 1998; Smith and Norris 2000; Gleeson 2007). It is not yet clear, however, whether such mechanisms manifest themselves as causes or consequences of the syndrome (Kraemer et al. 2008; Lucia et al. 2001).

The physical consequences of overload periods can include an increased risk of infection, reduced athletic performance, and a feeling of professional dissatisfaction. To mitigate these effects, some researchers suggest strategies related to nutritional monitoring of metabolic and hormonal responses while training, especially during these overload periods (Wade et al. 2005; Tremblay et al. 2004).

When muscles are subjected to intensive exercise, they use carbohydrates as the primary source of energy. Consecutive days of endurance training, especially if performed at high intensity and combined with insufficient intake of carbohydrate, can result in glycogen depletion and negatively affect the restoration of skeletal muscle. Furthermore, the ability to recover from post-training muscular micro damage is reduced, as a consequence of a marked catabolic state (Gleeson 2007).

Energy intake and the concentration of nutrients in the diet can influence hormonal concentrations in the body, and so affect the control of physiological mechanisms related to recovery. A number of research groups (see Judelson et al. 2008; Kraemer et al. 1998) have focused on the responses of the hormones testosterone, GH, cortisol, and IGF-1 in monitoring nutritional status when considering depletion and resynthesis of glycogen, loss or gain of muscle mass, and control of body fat.

Some studies have shown that CHO supplementation can affect hormonal and metabolic responses during high-intensity intermittent exercise (Wouassi et al. 1997; de Sousa et al. 2007).

Achten et al. (2004), for example, found an improvement in physical performance and in the mood of runners who received a diet with concentrations of CHO-8 g/kg of body weight (bw) compared with a low CHO diet (~5 g/kg-CON bw) during a 11 days period of intensified training. In comparison, those in the CON trials showed a reduction of $8.2 \pm 2.1\%$ in athletic performance over 16 km. Meanwhile, Kirwan et al. (1988) carried out a study over 5 days of training overload and found that runners who ingested 4 g CHO/kg bw reported a higher rating of perceived exertion (RPE) during the test performance in comparison with runners who ingested 8 g CHO/kg bw.

Although studies such as these suggest a link between CHO intake, athletic performance, and the potential of developing overtraining syndrome during periods of intense training, most of the research so far has been based on experimental designs that severely restrict carbohydrate intake ($\leq$5 g of CHO/kg bw). There is still a lack of literature, both for the baseline metabolic and hormonal responses and the effect of micro cycles of high-intensity exercise on highly competitive runners who consume >7 g CHO/kg bw/day with or without CHO supplementation.

The present study analyzed the cumulative effects of a micro cycle period of overload training (8 days) on blood hormones and metabolic profile of competitive endurance runners who were given carbohydrate supplementation. The study also investigated the effects of CHO supplementation during a standardized high-intensity intermittent exercise protocol and athletic performance test (9th day). If the study showed a reduction in the athletes' stress hormone levels and an improvement in their physical performance, then it would support the benefits of CHO supplementation both for the quality of training and the prevention of muscle damage, resulting from attenuation of catabolism.

Methods

Subjects

The experimental protocol was approved by the Local Committee on Ethics of Research in humans. After having signed an informed consent form, 24 competitive endurance runners participated in the study. The participants have been training for the past 8.61 ± 1.08 years and regularly participate in state, national, and international competitions. Data regarding the physical profile and training of the athletes are shown in Table 1.

General design

Approximately 4–5 days before the beginning of the experimental protocol, the runners were asked to fast for 12 h before visiting the laboratory for a variety of tests including the collection of the first blood samples (−9 days baseline for measurements just before they underwent 8 days of the intensified training program), measurement of maximal oxygen uptake, and determination of body composition through dual energy X-ray absorptiometry (DXA). The runners were then assigned randomly, using a double-blind

Table 1 Mean (±SEM) biometric and performance characteristics of the participants and duration of training (n = 24)

Variable	CHO	CON	p Value (CHO vs. CON)
Age (years)	29.1 ± 1.6	26.9 ± 1.9	>0.05
Height (cm)	169.5 ± 2.0	170.2 ± 2.5	>0.05
Weight (kg)	60.2 ± 1.4	62.3 ± 1.6	>0.05
Percent body fat[a]	8.3 ± 0.3	9.9 ± 0.5	0.0043
Best 10 km result (min)	29.7 ± 0.4	31.6 ± 0.4	0.0017
3 km time trial (min)	8.5 ± 0.1	9.3 ± 0.1	<0.0001
HR_{max} (bpm)	175.9 ± 1.4	177.5 ± 2.4	>0.05
VO_{2max} [ml/(kg min)]	69.8 ± 2.2	68.5 ± 1.9	>0.05
Duration of training (years)	9.5 ± 1.6	7.4 ± 1.2	>0.05

[a] Evaluated by dual energy X-ray absorptiometry (DXA; Hologic QDR—2000 W)

design, in two groups. The CHO group was assigned to a diet containing ~61% CHO, while the control group (CON) was assigned to a diet containing ~54% CHO to follow during the period of training overload. The CHO group received 1 g CHO/kg bw/h of maltodextrin to be ingested during training in the morning, and that amount is included in the 61% CHO in the CHO group. After 8 days of intensified training, the athletes performed intermittent running and their metabolic and hormonal responses as well as their physical performance were evaluated. All runners performed a 3-km time trial and the overload training program on a synthetic surface running track. The total duration of the study was 15 days.

Preliminary testing

The athletes were submitted to a 3-km running performance test for calculation of the mean velocity (V_m 3 km) and the velocity at which runners should exercise for the intermittent exercise sessions as proposed by Simões et al. (2005), Grant et al. (1997) and Hill and Rowell (1996). Participants were also submitted, on a different day, to an incremental running test on a treadmill until exhaustion in order to determine the maximal oxygen consumption (VO_{2max}). The VO_{2max} was determined using a Sensor VO_{2max} metabolic cart in the Unit of Cardiovascular Rehabilitation and Exercise Physiology of the Incor-HC FMUSP. Table 1 shows the results of the 3-km performance trial for all participants along with their cardiovascular variables. The two groups showed significant differences in running performance; however, the training profiles of the participants of both groups were quite similar (Table 1). The differences between the performance ability of the two groups might have been a limitation of this study.

Diet

Athletes in the CHO group had a habitual energy intake of 58.2 ± 2.7 kcal/kg bw, 59.6 ± 1.4% CHO, 15.6 ± 0.7% protein, and 24.8 ± 1.8% lipids. The CON group had a habitual intake of 51.3 ± 1.7 kcal/kg bw, 54.8 ± 1.8% CHO, 16.7 ± 0.6% protein, and 28.2 ± 1.3% of lipids.

The athletes received a form to record the types and quantities of all food eaten before and during the 9 days of intense training. To aid in the codification of foods recorded in a dietary diary (DD), a handbook of information containing photographs of portion sizes, types, and sizes of food was given to each participant. In addition to the information found in the DD and in the handbook, the volunteers received individual guidance on how to record food intake, through demonstrations of portion sizes, food portions, and volume. The nutritional calculations were made using the software, Decision Support in Nutrition, Version 2.5, UNIFESP (1993) and TACO, Brazilian Table of Food Composition (2006).

Experimental trials

The overload training program

After the completion of preliminary testing and the first blood sample (−9 days baseline) collection, participants underwent 13 intense training sessions over 8 days. Of these sessions, eight were held in the morning (days 1 through 8) and five in the afternoon (days 1 through 5). The participants were re-evaluated on the ninth day. The training program consisted of continuous and intermittent running, concentrated mainly in the morning. The intermittent training sessions were performed on days number 2, 4, and 6 and consisted of 5–10.4 km of running at intensities corresponding to, or above 100% V_m 3 km. Specifically, on day 2 the athletes performed 1 × 2000 m with 2 min of recovery followed by 4 × 1000 m with 1 min 30 s apart; on day 4 they performed 16 × 400 m with a pause of 1 min in between followed by 4 × 1000 m with 2 min apart for recovery; and on day 6 they performed 25 × 200 m with a pause of 1 min for recovery. The recovery periods between running were active (easy walking). On days number 1, 3, 5, and 8 the participants performed continuous running (12–18 km at 80–90% V_m 3 km), and 20–25 km at 70–80% V_m 3 km carried out on day number 7. In the afternoons of days 1 through 5 the training program was composed of continuous running at moderate intensity (~45 min, 75% V_m 3 km).

Post training program testing

On the ninth day, the athletes, who had been asked to fast, arrived at the running track to have the first of a series of

blood samples taken. Following the blood sampling, the athletes ingested a standardized breakfast 140 min before the protocol of exercises started (energy 770 kcal, carbohydrate 132.8 g). The protocol of intermittent running consisted of ten series of 800 m that were performed at the speed corresponding to V_m 3 km, with pauses of 1 min 30 s for recovery and two maximum performance tests of 1000 m. The first maximum performances test was performed 20 min before the start of the intermittent exercise session and the second test was performed 20 min after the end of the intermittent exercise session.

Prior to beginning the exercise protocol, the volunteer athletes warmed up for 30 min performing light exercises and stretching [15 min of running (75% of HR_{max}) and 15 min of stretching, coordination exercises, and progressive running]. During the days of intense training the athletes were also instructed to get sufficient sleep, and to refrain from strenuous activities for at least 24 h prior to testing.

The participants ingested solutions containing maltodextrin (CHO group) or water artificially sweetened with aspartame for the CON group, indistinguishable with respect to color.

Before the start of testing (−30 min), the athletes received 4 ml/kg bw of a solution containing 7% CHO or the CON equivalent. This solution was offered immediately after the first test of 1000 m and after the tenth series of 800 m. During the high-intensity intermittent running, they ingested 2 ml/kg bw of a solution containing a 7% CHO or the CON equivalent after each two series, until the end of the protocol of exercises. In summary, they ingested fluids a total of 5 times (after series 1, 3, 5, 7 and 9). After the second test of 1000 m, they continued receiving 3 ml/kg bw of water containing supplemental CHO at a concentration of 1.2 g/CHO/kg bw (CHO) or the CON equivalent at 0 and 60 min in the recovery period (Scheme 1). Between the intervals of the recovery period the athletes ingested water ad libitum. The temperature of the CHO or CON solutions ingested during the tests did not exceed the range of 4–7°C. At the end of each series the Borg scale with scores from 6 to 20 was applied to evaluate the rating of perceived exertion (RPE) (Borg 1982). The athletes reported scores between 6 indicating a perception of low physical exertion and 20 indicating a perception of extreme exertion. Before, during, and after the series, the heart rate (HR) of the athletes was monitored (Sport Tester, Polar Electro, OY, Kempele, Finland). During the days in which the experiment took place, the temperature of the environment was noted as being between 19.4 and 25°C with a humidity of 60–76%.

On the ninth day the blood samples were collected on six occasions: baseline (−140 min), pre (−30 min), immediately after the tenth series of 800 m (post 10 × 800 m), just after the second 1000 m maximum running performance (2nd post 1000 m), and at 15 min and 80 min of recovery (Scheme 1).

Blood sampling and analysis

Venous blood samples of 7 ml were collected at seven different time points [baseline (−9 days), baseline (−140 min), pre (−30 min), post 10 × 800 m, 2nd post 1000 m, 15 and 80 min of recovery] for determination of plasma glucose and lactate, and serum cortisol. The hormones testosterone, IGF-1, and IGFBP-3 were collected at the following time points: baseline (−9 days), baseline (−140 min), post 10 × 800 m, and 80 min of recovery. All hormone measurements were performed in duplicate.

Blood samples for the measurements of glucose and lactate were centrifuged in a cooled microcentrifuge (4°C) at 3000 rpm for 10 min and afterwards these samples were kept on ice, and the heparinized plasma was separated within the first hour. These samples were then divided and stored at −70°C for lactate, and −20°C for glucose. Once the hydration status control was kept the same over the study for both groups, the samples were not adjusted for changes in plasma volume.

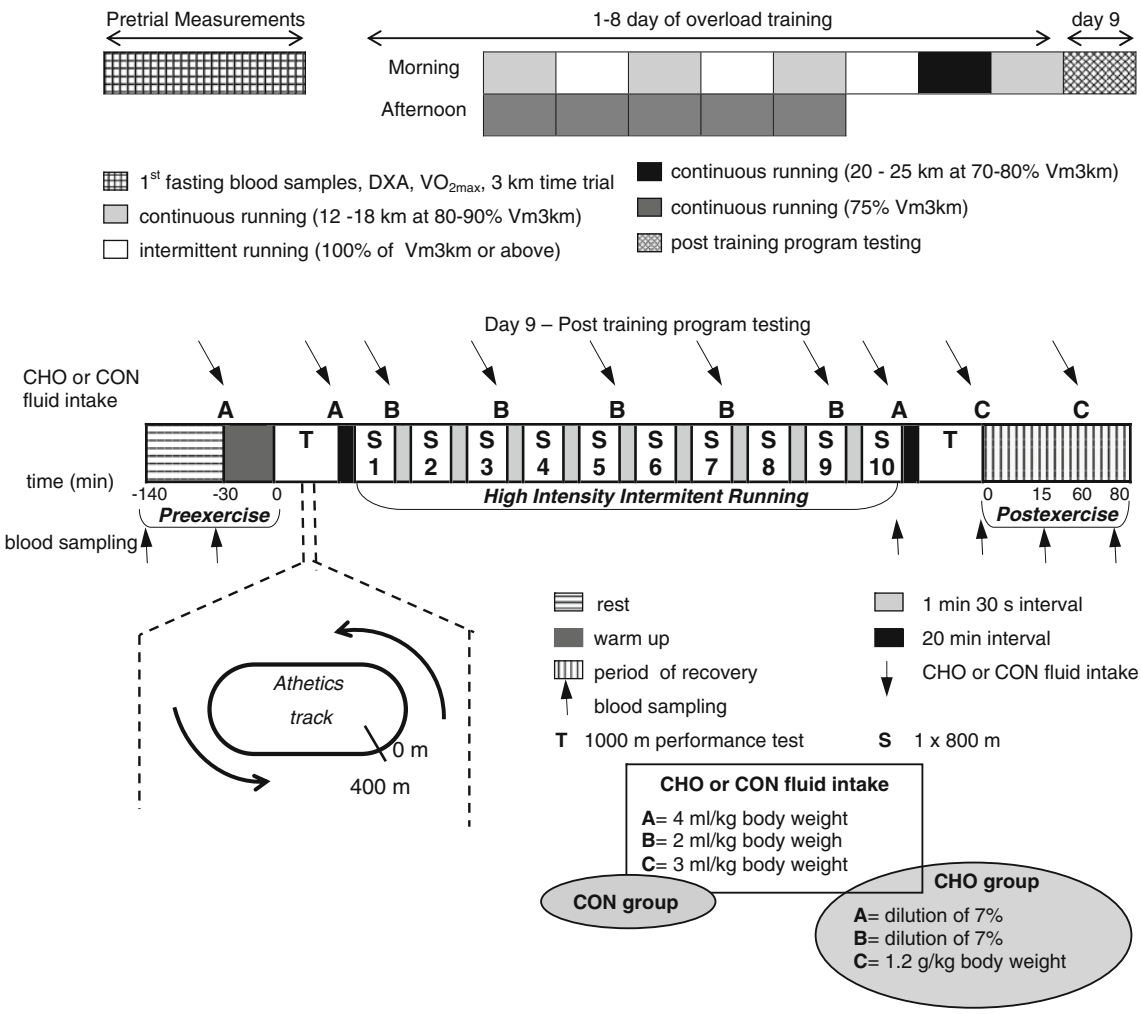
To measure plasma glucose concentration, we applied the enzymatic method with glucose oxidase–peroxidase using the commercial kit, Diagnostic Labtest, followed by spectrophotometry using a spectrophotometer UV/visible ULTROSPEC model 3100 pro. Plasma lactate concentration was measured using a lactate analyzer (Yellow Springs Instruments, YSI 2700).

Serum samples for measurement of hormonal concentrations were centrifuged at 4°C in a Sorvall RC3 Plus at 2000 rpm (rotor H-2000b) for 15 min. The serum aliquots were kept frozen at −20°C.

The ratios of the hormones IGF1/IGFBP3 and testosterone/cortisol were calculated. The concentrations of the hormones IGF1 and IGFBP3 were determined using the chemiluminescent immunoassay method using the Immulite kit from Siemens, Los Angeles. The total testosterone and cortisol concentrations were determined through the fluoroimmunoassay method using the automated Autodelfia kit from Perkin Elmer, Finland.

Statistical analysis

In this study we applied a two-way ANOVA test with repeated measures to verify differences in the CHO and CON groups (treatment by time). If significant, a Tukey–Kramer test was used post-hoc. Also, a *t* test for unpaired samples was applied for diet, anthropometric, training program, and some of the performance variables. The level of statistical significance used in the tests was 5%. For all



Scheme 1 Schematic illustration of experimental design

analyses we used the software SPSS version 10.0.1. The results are given as means and SEM.

Results

Diet and training program

No significant differences were observed with regards to energy intake between the two groups (CHO 64.9 ± 4.7 vs. CON 56.6 ± 3.1 kcal/kg bw). CHO intake was significantly greater in the CHO group (9.9 ± 0.7 g/kg bw) versus the CON group (7.7 ± 0.6 g/kg bw). The percentage of CHO, lipids, and proteins in the CHO group were 60.8 ± 0.9, 23.4 ± 0.8, and 15.4 ± 0.6%, respectively. In the CON group these values were 53.9 ± 1.1, 28.3 ± 0.8, and 17.5 ± 0.5%. The weight of the volunteers was practically the same before and after the training program (CHO 60.2 ± 1.4 and 60.4 ± 1.3 kg; CON 62.3 ± 1.6 and 62.7 ± 1.8 kg; before and after, respectively). The total duration of the 8-day training program was 624.1 ± 23.5 min for the CHO group and 578.5 ± 12.6 min for the CON group, without significant difference between them.

Intermittent running protocol and performance test

No significant differences were found in either group the first or the last (10th) series of 800 m (CHO 136.4 ± 1.3 and 139.5 ± 2.1 s; CON 147.9 ± 2.1 and 154 ± 2.6 s, respectively) during the session of intermittent running. When evaluating the percentage decrease (%difference) between the series 1 and 5 and 6 and 10, there were no significant differences between the CHO (1.6 ± 0.5%) and CON (3.0 ± 0.9%) groups. We observed a significant performance decrease in the last maximum 1000 m test for both groups, the percentage of decrease was significantly lower in the CHO group versus CON group (5.3 ± 1.0 vs. 10.7 ± 1.3%, $p < 0.05$) (Table 2). At the end of the running

Table 2 Mean (±SEM) rating of perceived exertion (RPE) and time obtained for each 800 m series and maximum test of 1000 m

	CHO	CON	*p* Value (CHO vs. CON)
10 series of 800 m			
Rating of perceived exertion			
Pre-series	9.9 ± 0.7	10.8 ± 1.0	>0.05
1st series	14.1 ± 0.8	12.5 ± 0.5	>0.05
10th series	18.9 ± 0.5[a]	18.2 ± 0.4[a]	>0.05
Mean of the series	16.6 ± 0.5	15.8 ± 0.4	>0.05
Performance time			
Mean time of the series (min)	23.3 ± 0.3	25.3 ± 0.4	0.0002
Maximum run of 1000 m			
Rating of perceived exertion			
Pre 1st 1000 m	6.8 ± 0.3	8.3 ± 0.7	>0.05
Pre 2nd 1000 m	11.7 ± 0.9[a]	13.0 ± 0.9[a]	>0.05
%Difference (Pre 1st –2nd)	74.6 ± 15.6	67.1 ± 17.7	>0.05
1st 1000 m	16.3 ± 0.7	14.7 ± 0.6	>0.05
2nd 1000 m	17.5 ± 0.4	17.6 ± 0.7[a]	>0.05
%Difference 1000 m (1st–2nd)	8.8 ± 4.2	21.0 ± 5.7	>0.05
Performance time			
1st 1000 m (s)	158.6 ± 1.4	164.2 ± 2.0	0.03
2nd 1000 m (s)	167.1 ± 2.0[a]	181.5 ± 2.2[a]	0.0002
%Difference 1000 m (1st–2nd)	5.3 ± 1.0	10.7 ± 1.3	0.0035

[a] Significant difference when compared to the first series ($p < 0.05$)

protocol on the ninth day the reduction in weight was −1.4 ± 0.3% in the CHO group and −1.0 ± 0.1% in the CON group.

Heart rate and rating of perceived exertion

In the session of intermittent running, there was no significant difference with respect to the magnitude of the heart rate (HR), when the mean values of the ten series (CHO 181.9 ± 1.6 bpm and CON 184.9 ± 2.3 bpm) and the average between series 1–5 (CHO 179.7 ± 1.7 bpm and CON 183.4 ± 2.4 bpm) and 6–10 (CHO 184.0 ± 1.6 bpm and CON 186.4 ± 2.2 bpm) were compared. These mean values of HR were still above the HR_{max} obtained by ergoespirometric examination (Table 1).

Even in HR, no significant difference was observed after the two maximum tests of 1000 m (CHO 177.9 ± 2.7 and 177.9 ± 2.4 bpm, CON 183.9 ± 2.7 and 183.8 ± 3.1 bpm, respectively).

As illustrated in Table 2, the mean Borg scale score immediately before the ten sets of 800 m was 10, after the first series of 800 m it was 13, reaching nearly 19 at the end of the session of exercise. Comparing the maximum tests of 1000 m, there was no significant increase in the RPE score in the CHO group (8.8 ± 4.2%). This increase was significant in the CON group (21.0 ± 5.7%, $p < 0.05$).

Plasma metabolites and hormones

Overload training

The −9 day and −140 min baselines values for glucose, lactate, cortisol, IGF-1, IGFBP-3 and the testosterone/cortisol, and IGF1/IGFBP3 ratios were not significantly different between the CHO and CON groups (Figs. 1, 2, 3; Table 3). The testosterone concentrations were higher for the CHO group than for the CON group (694.0 ± 54.6 pmol/l vs. CON: 610.8 ± 47.9 pmol/l) (Fig. 4). The IGF1 baseline level remained the same after 8 days of training in the CHO group (from 223.7 ± 21.9 to 226 ± 14.8 ng/ml baseline) in contrast to the CON group (from 222.5 ± 18.7 to 261.9 ± 26.5 ng/ml, $p < 0.05$) (Table 3).

Intermittent running protocol and performance test

When responses of the intermittent running protocol (9th day) were evaluated, a significant increase in glucose in the CHO group (159.6 ± 16.4 mg/dl) was observed, when compared with the CON group (105.5 ± 9.3 mg/dl). Even during the recovery period, glucose concentrations were still higher in the CHO group (15 min: 158.8 ± 17.3 mg/dl and 80 min: 106.1 ± 5.2 mg/dl) compared with the CON group (81.5 ± 7.9 mg/dl and 77.7 ± 1.6 mg/dl, respectively).

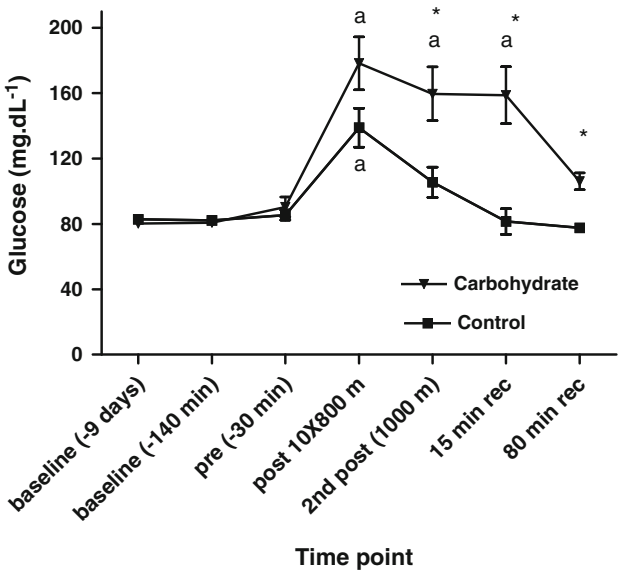


Fig. 1 Mean (±SEM) plasma glucose concentration. **a** Significant difference compared with the pre-exercise condition (−30 min) ($p < 0.05$). *Significant difference between the carbohydrate and control groups ($p < 0.05$)

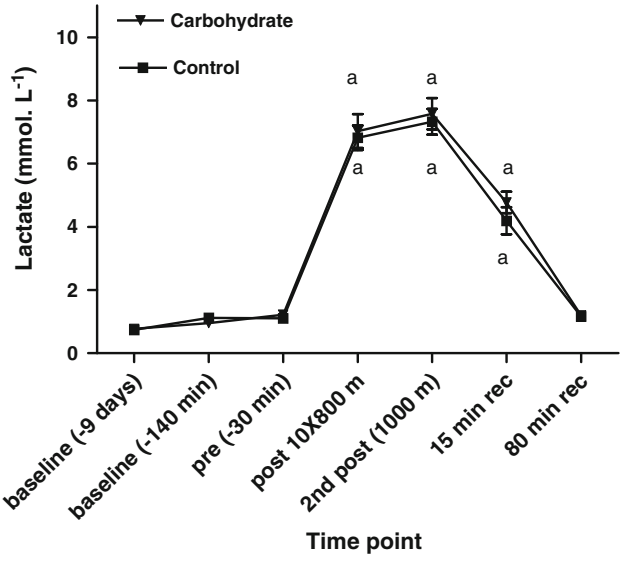


Fig. 2 Mean (±SEM) plasma lactate concentration. **a** Significant difference compared with the pre-exercise condition (−30 min) ($p < 0.05$)

With regards to the time of collection, there was a significant increase in blood glucose during the ten series of 800 m in both groups compared with pre-exercise values (−30 min) ($p < 0.05$). These concentrations remained elevated in the CHO group 15 min into the recovery period (Fig. 1).

The lactate concentration increased significantly after the session of intermittent exercise (CHO 7.0 ± 0.5 mmol/l and CON 6.8 ± 0.4 mmol/l) and remained

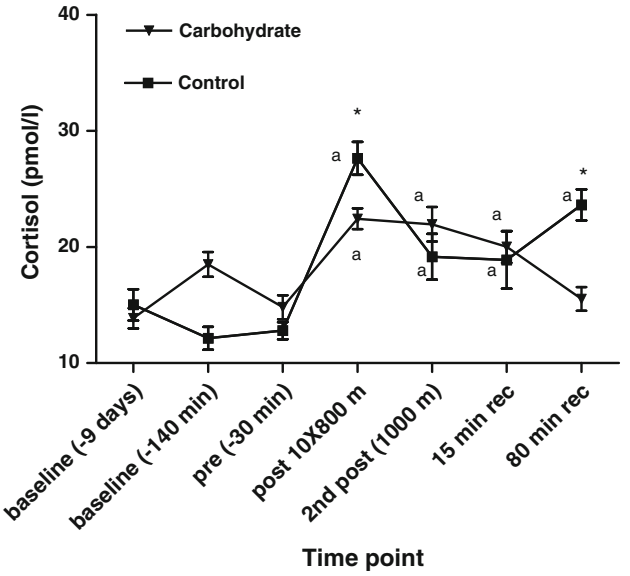


Fig. 3 Mean (±SEM) serum cortisol concentration. **a** Significant difference compared with the pre-exercise condition (−30 min) ($p < 0.05$). *Significant difference between the carbohydrate and control groups ($p < 0.05$)

high 15 min into the recovery period for both groups (CHO 4.8 ± 0.3 mmol/l and CON 4.2 ± 0.4 mmol/l) (Fig. 2). There were no significant differences when comparing the two groups.

There was a significant increase in cortisol concentrations during exercise in both groups when compared with the rest condition. These concentrations remained elevated at 15 min into the recovery period and returned to pre-exercise values (−30 min) only at 80 min in the CHO group (Fig. 3), resulting in a lower response in the CHO group in comparison with the CON group (CHO 15.5 ± 1.0 pmol/l vs. CON 23.6 ± 1.3 pmol/l).

In both groups, the concentrations of testosterone were significantly lower at 80 min of recovery time when compared with the −140 min baseline values (CHO 390.0 ± 35.7 and 771.7 ± 34.2 pmol/l vs. CON 341.5 ± 57.9 and 600.7 ± 60.7 pmol/l, respectively, see Fig. 4).

Figure 5 shows that the testosterone/cortisol ratio was not attenuated in the CHO group after the exercise. When compared with the −140 min baseline values, the ratio was significantly lower in both groups at 80 min of recovery (CHO 43.0 ± 2.5 and 27.3 ± 4.2 vs. CON 54.3 ± 7.5 and 15.2 ± 2.9, respectively).

Both groups showed no significant differences in IGFBP3 hormone levels during or after the sessions of exercises. The IGF1 concentration and IGF1/IGFBP3 ratio were higher after exercise in the CHO group (IGF1: 265.6 ± 18.1 ng/ml and IGF1/IGFBP3 ratio: 56.8 ± 2.4) than at −140 min (226.0 ± 14.8 ng/ml and 50.4 ± 2.0, respectively) (Table 3).

Table 3 Mean (±SEM) IGF1/IGFBP3 ratio and IGF1 and IGFBP3 serum concentrations

	Group	Baseline (−9 days)	Baseline (−140 min)	Post 10 × 800 m	80 min rec
IGF1 (ng/ml)	CHO	223.7 ± 21.9	226 ± 14.8	265.6 ± 18.1[a]	229.8 ± 17.5
	CON	222.5 ± 18.7	261.9 ± 26.5[a]	263.6 ± 21.9	241.8 ± 20.4
IGFBP3 (mg/l)	CHO	23.5 ± 6.2	22.5 ± 6.7	22.7 ± 6.6	20.4 ± 5.9
	CON	15.3 ± 6.2	16.2 ± 6.3	20.3 ± 6.8	16.3 ± 6.2
IGF1/IGFBP3 ratio	CHO	53.8 ± 2.7	50.4 ± 2.1	56.8 ± 2.4[a]	52.7 ± 2.9
	CON	48.9 ± 2.5	52.9 ± 3.3	51.9 ± 2.6	50.1 ± 2.8

[a] Significant difference compared to the baseline condition (−140 min) ($p < 0.05$)

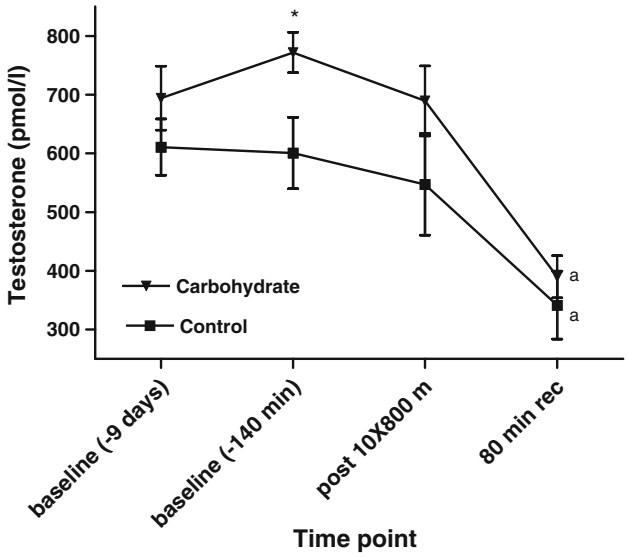


Fig. 4 Mean (±SEM) serum total testosterone concentration. **a** Significant difference compared with the baseline condition (−140 min) ($p < 0.05$). *Significant difference between the carbohydrate and control groups ($p < 0.05$)

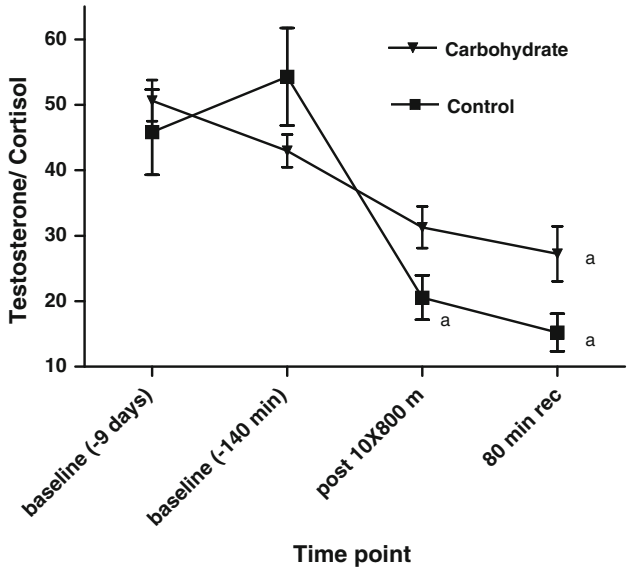


Fig. 5 Mean (±SEM) cortisol/total testosterone ratio. **a** Significant difference compared with the baseline condition (−140 min) ($p < 0.05$)

Discussion

This study investigated the effects of carbohydrate supplementation during an overload training program on metabolic and hormonal responses of competitive endurance runners. In addition, we attempted to assess the impact of a protocol of intermittent high-intensity running on metabolic, hormonal, cardiovascular and perceptual responses, and running performance before, during and after this protocol for athletes who had, and had not, been given CHO supplementation. The volunteer athletes who took part in the study were randomly assigned to two groups—one of which was given CHO supplementation (CHO group) and the other group was the control (CON).

The biometric data, the performance characteristics, the training volume, and the energy intake provided by the runners from both groups, classified them as high-performance athletes.

The sessions of exercises were performed at the speed corresponding to V_m 3 km. A number of studies have associated V_m 3 km with VO_{2max} or very close to it (Hill and Rowell 1996; Grant et al. 1997; Simões et al. 2005), which can be confirmed by the responses of heart rate (HR) and RPE observed during the running series in this study, which was performed at V_m 3 km.

All hormonal variables at the −9 day baseline were similar for both groups. Initially, we assumed that the responses of such variables would also be similar after 8 days of intensive training. However, after this period testosterone concentrations were significantly higher in the CHO group, demonstrating a possible increase in the anabolic response when compared with the CON group. The reduction of this hormone is one of the primary effects of overtraining in men (Wade et al. 2005). The dietary manipulation could possibly be used to mitigate the symptoms associated with this syndrome, which can compromise an athlete's career.

Studies by Dressendorfer and Wade (1991) and Keizer et al. (1989) observed a reduction in the concentration of

testosterone in endurance athletes after a prolonged training program. So, it is possible that the carbohydrate supplement taken by some of the athletes in the current study has attenuated the post-exercise production of stress hormones, leading to an increase in testosterone concentration at −140 min baseline values.

Thus, the nutritional intervention used for both groups over the 8 days of training was effective in preserving the metabolic and hormonal profiles indicating attenuation of metabolic stress. These findings corroborate the studies of Alemany et al. (2008), Ormsbee et al. (2006) and Isley et al. (1984) indicating that in comparison with athletes eating a diet restricted in energy and protein, the hormones testosterone, IGF1 and IGFBP3 are maintained at normal physiological concentrations when energy intake is adequate. In this study runners from both groups showed similar energy intake, and as suggested by Elloumi et al. (2005) this condition could help explain why IGFBP3 levels were maintained.

In addition, these observations suggest that the symptoms of overreaching, the term used for the initial phase of overtraining syndrome when athletes notice a decrease in the ability to train and physical performance, could be controlled by monitoring the catabolic status using the testosterone/cortisol and IGF1/IGFBP3 ratios (Banfi and Dolci 2006; Elloumi et al., 2005). When comparing the ratios of baseline values in both experimental groups, no significant differences were found. This may explain the fact that higher IGF1 levels in the CON group were linked to carrier proteins (IGFPB3). However, when the intermittent exercise session was evaluated in the CHO group, the higher testosterone/cortisol and IGF1/IGFBP3 ratios indicating less catabolic stress was observed, a fact which may have resulted in a smaller percent-wise reduction in performance in the 1000 m test.

Even though the athletes from both groups showed different running performances (3 and 10 km; Table 1), this probably had no effect on the results of this study since the exercise training prescription was done on an individual basis, and at the same relative intensities (i.e. % of V_m 3 km). Furthermore, it is difficult to conduct a research plan having elite endurance runners as participants, in an experimental design where they had to submit themselves to the proposed training program, besides having to ingest some kind of supplementation, which may in turn make participants interrupt the protocol prematurely.

According to Maso et al. (2004), the reduction in the ratio of testosterone/cortisol is indicative of tiredness. Furthermore, the higher testosterone levels after 8 days of intensive training, as well as the lower cortisol post-exercise response in the CHO supplemented group may have contributed to the attenuation of the decrease in the testosterone/cortisol ratio and may have caused a number of benefits to the body such as better post-exercise muscle damage recovery, better modulation of immune response, improved bone and muscle health, and attenuation of the endocrine system's stress.

The metabolic stress induced by the type of exercise used in this study was evaluated using cardiovascular, perceptual, glucose, and lactate responses. In the CHO group, an increase in glucose concentration was observed from the end of the intermittent exercise session until 80 min of recovery. The adopted carbohydrate manipulation resulted in the increased concentrations of glucose (exogenous) reducing the use of glycogen stores, which could result in increased availability of substrate, stimulating glycolysis and consequently increased concentrations of lactate during exercise. The results of de Sousa et al. (2007) are similar to those found in this study, indicating increased glycolytic activity and lower utilization of glycogen stores in the supplemented group.

Furthermore, the post-exercise increase in glucose in the CHO group attenuated the response of glycogenesis-suppressing cortisol, probably resulting in less depletion of muscle proteins. Such anabolic responses may also be related to the increase in IGF1 values and the IGF1/IGFBP3 ratio during exercise in the CHO group. Moreover, the effects may have encouraged regulatory hormones to increase the synthesis of glycogen during the resting intervals between series. The increased cortisol concentration in the CON group helped to maintain blood glucose levels during intermittent exercise.

The hormonal responses observed on the ninth day could be consequences of the supplementation with CHO during the training overload. Some studies that investigated the effects of supplementation with CHO in acute intermittent high-intensity exercise found no reduction in the cortisol responses (Bishop et al. 1999; de Sousa et al. 2007).

It can be concluded from the present study that in spite of supplementation with CHO most baseline values were not affected. It is possible that it attenuates the suppression of the hypothalamic pituitary gonadal axis, increasing the concentration of testosterone after 8 days of training overload. In addition, CHO supplementation was effective when carrying out sessions of intermittent exercise, where it resulted in a lower cortisol response and an attenuated decrease in the testosterone/cortisol ratio post exercise. This response may be associated with an improved physical performance for the CHO supplemented runners in relation to CON, as demonstrated by the 5% attenuation on the velocity decrease during the second 1000 m of running. Based on these finding, we would suggest that carbohydrate ingestion during overload training program should be close to 10 g/kg bw/day in order to maintain the anabolic state of the athletes.

The findings of this study emphasize the need for supplementation with CHO in high-performance athletes during

high-intensity interval and distance training, both lasting less than 1 h and representing typical stages of overload training programs. In addition, the study indicates the need for nutritionists on sports teams to give advice on diet and the importance of having an adequate carbohydrate intake—potential performance enhancing factors that are still neglected by some athletes.

Acknowledgments The authors thank FAPESP for the fellowship granted as well as Claire Neesham and Allan Jorgensen for proofreading the manuscript.

References

Achten J, Halson SL, Moseley L, Rayson MP, Casey A, Jeukendrup AE (2004) Higher dietary carbohydrate content during intensified running training results in better maintenance of performance and mood state. J Appl Physiol 96:1331–1340

Alemany JA, Nindl BC, Kellogg MD, Tharion WJ, Young AJ, Montain SJ (2008) Effects of dietary protein content on IGF-I, testosterone, and body composition during 8 days of severe energy deficit and arduous physical activity. J Appl Physiol 105:58–64

Banfi G, Dolci A (2006) Free testosterone/cortisol ratio in soccer: usefulness of a categorization of values. J Sports Med Phys Fitness 46:611–616

Banfi G, Marinelli M, Roi GS, Agape V (1993) Usefulness of free testosterone/cortisol ratio during season of elite speed skating athletes. Int J Sports Med 14:373–379

Bishop NC, Blannin AK, Robson PJ, Walsh NP, Gleeson M (1999) The effects of carbohydrate supplementation on immune responses to a soccer-specific exercise protocol. J Sports Sci 17:787–796

Borg GAV (1982) Psychophysical bases of perceived exertion. Med Sci Sports Exerc 14:377–381

Brenner J, Shek PN, Zamecnik J, Shepard RJ (1998) Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. Int J Sports Med 19:130–143

de Sousa MV, Simões HG, Oshiiwa M, Rogero MR, Tirapegui J (2007) Effects of acute carbohydrate supplementation during sessions of high-intensity intermittent exercise. Eur J Appl Physiol 99:57–63

Dressendorfer RH, Wade CE (1991) Effects of a 15-d race on plasma steroid levels and leg muscle fitness in runners. Med Sci Sports Exerc 23:954–958

Elloumi M, El Elj N, Zaouali M, Maso F, Filaire E, Tabka Z, Lac G (2005) IGFBP-3, a sensitive marker of physical training and overtraining. Br J Sports Med 39:604–610

Gleeson M (2007) Immune function in sport and exercise. J Appl Physiol 103:693–699

Grant S, Craig I, Wilson J, Aitchison T (1997) The relationship between 3 km running performance and selected physiological variables. J Sports Sci 15:403–410

Hill DW, Rowell AL (1996) Running velocity at VO_{2max}. Med Sci Sports Exerc 28:114–119

Isley WL, Underwood LE, Clemmons DR (1984) Changes in plasma somatomedin-C in response to ingestion of diets with variable protein and energy content. J Parenter Enteral Nutr 8:407–411

Judelson DA, Maresh CM, Yamamoto LM, Farrell MJ, Armstrong LE, Kraemer WJ, Volek JS, Spiering BA, Casa DJ, Anderson JM (2008) Effect of hydration state on resistance exercise-induced endocrine markers of anabolism, catabolism, and metabolism. J Appl Physiol 105:816–824

Keizer H, Janssen GM, Menheere P, Kranenburg G (1989) Changes in basal testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone sulfate in previously untrained males and females preparing for a marathon. Int J Sports Med 10:S139–S145

Kirwan JP, Costill DL, Mitchell JB, Houmard JA, Flynn MG, Fink WJ, Beltz JD (1988) Carbohydrate balance in competitive runners during successive days of intense training. J Appl Physiol 65:2601–2606

Kraemer WJ, Volek JS, Bush JA, Putukian M, Sebastianelli WJ (1998) Hormonal responses to consecutive days of heavy-resistance exercise with or without nutritional supplementation. J Appl Physiol 85:1544–1555

Kraemer WJ, Fragala MS, Watson G, Volek JS, Rubin MR, French DN, Maresh CM, Vingren JL, Hatfield DL, Spiering BA, Yu-Ho J, Hughes SL, Case HS, Stuempfle KJ, Lehmann DR, Bailey S, Evans DS (2008) Hormonal responses to a 160-km race across frozen Alaska. Br J Sports Med 42:116–120

Lucia A, Diaz B, Hoyos J, Fernández C, Villa G, Bandrés F, Chicharro JL (2001) Hormonal levels of world class cyclists during the Tour of Spain stage race. Br J Sports Med 35:424–430

Maso F, Lac G, Filaire E, Michaux O, Robert A (2004) Salivary testosterone and cortisol in rugby players: correlation with psychological overtraining items. Br J Sports Med 38:260–263

McKenzie DC (1999) Markers of excessive exercise. Can J Appl Physiol 24:66–73

Ormsbee M, Clapper JA, Clapper J, Vukovich MD (2006) Moderate changes in energy balance combined with exercise do not alter insulin-like growth factor I or insulin-like growth factor binding protein-3. Nutr Res 26:467–473

Simões HG, Denadai BS, Baldissera V, Hill DW, Campbell CSG (2005) Relationships and significance of lactate minimum, critical velocity, heart rate detection and 3000 m track-tests for running. J Sports Med Phys Fitness 42:441–451

Smith DJ, Norris SR (2000) Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. Med Sci Sports Exerc 32:684–689

TACO (2006) Tabela brasileira de composição de alimentos. NEPA-UNICAMP, Version II, 2nd edn. Campinas, São Paulo, 113 pp. http://www.unicamp.br/nepa/taco/. Accessed 30 September 2009

Tremblay MS, Copeland JL, Helder WV (2004) Effect of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men. J Appl Physiol 96:531–539

Wade CE, Stanford KI, Stein TP, Greenleaf JE (2005) Intensive exercise training suppresses testosterone during bed rest. J Appl Physiol 99:59–63

Wouassi D, Mercier J, Ahmaidi S, Brun JF, Mercier B, Orsetti A, Préfaut CH (1997) Metabolic and hormonal responses during repeated bouts of brief and intense exercise: effects of pre-exercise glucose ingestion. Eur J Appl Physiol 76:197–202