

Pedro Henrique Lopes Perim

Respostas sanguíneas e musculares à suplementação de bicarbonato de
sódio e subsequente desempenho do exercício

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa: Ciências do Sistema
Músculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Bryan Saunders

São Paulo

2021

Pedro Henrique Lopes Perim

Respostas sanguíneas e musculares à suplementação de bicarbonato de sódio e subsequente desempenho do exercício

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Ciências do Sistema Músculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Bryan Saunders

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010. A versão original está disponível na Biblioteca Central FMUSP)

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Perim, Pedro Henrique Lopes

Respostas sanguíneas e musculares à suplementação de bicarbonato de sódio e subsequente desempenho do exercício / Pedro Henrique Lopes Perim. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientador: Bryan Saunders.

Descritores: 1.Bicarbonato de sódio 2.Suplementos nutricionais 3.Prótons 4.Desempenho atlético 5.Ciências da nutrição e do esporte 6.Fenômenos fisiológicos da nutrição esportiva

USP/FM/DBD-410/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico a Junia, Paulo, Paulinho, Paola, Manuella, Isabella, Laura e Deus. Tudo que eu faço são por vocês.

AGRADECIMENTOS

Acho que eu sempre esperei por esse momento, descrever aqui minha forma de gratidão a muitas pessoas que me ajudaram nesse caminho. Lembro quando eu estava na iniciação científica e fiquei “triste” por não ter agradecimento no meu relatório final. Enfim, chegou a hora.

Primeiramente, eu gostaria de agradecer muito a Deus. Seria uma grande hipocrisia não citá-lo aqui, pois em diversos momentos difíceis ele é o primeiro a ser chamado e sempre me deu forças para continuar e nunca desistir dos meus objetivos.

Gostaria também de agradecer (e muito) a minha família, minha base, que sempre fez tudo que podia e que não podia por mim. Talvez esse seja um jeito super simples de retribuir tudo o que fizeram, mas para mim, esse talvez seja um dos grandes orgulhos que eu possa dar. Junia, Paulo e Paulinho, obrigado por tudo e por se fazerem tão presente, mesmo distante. Cada ligação por videochamada, enche o meu coração de amor e energia para ir atrás dos meus sonhos.

Gostaria também de agradecer a minha Tia Jane, que sempre esteve tão presente e sempre foi uma das grandes motivadoras para isso acontecer.

Ganhei uma família em São Paulo, tenho muita sorte em ter isso. Laura, Sandro, Simone e Pedro, obrigado por me acolherem como filho, namorado e irmão mais velho. Obrigado por ouvirem minhas angústias e ter sempre um conselho e palavras de apoio quando necessário, afinal, Deus nunca te dá um fardo maior que você possa carregar, não é mesmo?! Talvez essa tenha sido a frase mais marcante da minha vida, e saibam, ela sempre é minha fortaleza para os dias mais complicados.

A minha motivação para buscar a ciência partiu de alguns ombros amigos, que foram minha grande fortaleza durante minha graduação. Portanto, seria egoísmo agradecer apenas pelos últimos três anos, sendo que algumas pessoas tiveram grande influência

nisso. Nesse momento, quero agradecer aos grandes amigos que a nutrição me deu: Renan, Pietro e Felipe Ribeiro, vocês são inesquecíveis e sempre que eu lembrar de momentos de amizades, será impossível esquecer os nossos. Obrigado por tudo.

E por falar em nutrição, algumas pessoas foram anjos na minha vida profissional. Sempre fui muito grato a todas as oportunidades e pessoas que apareceram na minha vida, mas algumas delas, merecem o destaque. Queria agradecer a Valéria Arruda, uma das nutricionistas mais incríveis que eu conheço, lembro até hoje, eu estava saindo do banco, negociando uma dívida gigantesca que tive por ficar em São Paulo, e recebi sua ligação, confiando em mim, me enchendo de motivação e me convidando para o que foi uma das melhores coisas da minha vida profissional, fazer parte voluntariamente do Setor de Lípidos e Doenças Cardiovasculares.

Não daria para deixar de falar de uma das pessoas mais importantes na minha vida profissional: Brunno Falcão. Muitos carinhosamente brincam que ele é meu pai, e de fato, as atitudes são muito dignas de paternidade. Obrigado por todas as ligações, conselhos, puxões de orelha, oportunidades e confiança em mim. Daria uma outra dissertação se fosse listar todos os motivos de agradecimento que tenho por você, mas eu nunca esquecerei o primeiro sapato social que tive, foi graças a você. Obrigado por tudo.

E se não fosse aquele primeiro encontro na porta da sala na Escola de Educação Física da USP, que conheci um barbudo, com roupa de ciclismo que procurava um aluno de iniciação científica, e então, me passou o seu telefone. Em menos de 10 minutos mandei mensagem querendo saber mais e demonstrando meu interesse. Foi então, que virei aluno do melhor orientador que pode existir nesse mundo (sempre falo isso para todas as pessoas que me perguntam sobre iniciação científico ou mestrado). Bryan Saunders, obrigado por toda confiança. Sei que não fui o melhor aluno de mestrado do mundo, mas saiba que sou muito grato de ser o seu primeiro aluno de mestrado. Obrigado

por todas as conversas, oportunidades, corridas, hamburguer e cerveja. Você é uma pessoa incrível e mesmo não acreditando nisso, eu tenho certeza que foi Deus te colocou na minha vida.

Gostaria também de agradecer a todos os co-autores desse trabalho, em especial ao Breno Duarte, por toda parceria ao longo dos últimos anos, e alguns perrengues, como madrugar no laboratório nos feriados, viajar para Ribeirão Preto e esquecer as amostras. Além de todo trabalho, essas histórias ficarão para sempre. Gostaria de deixar meu agradecimento ao Dr. Luiz Riani, por toda disponibilidade por sempre ajustar sua agenda para que as biópsias acontecessem. Sem você, isso não teria sido viável. Obrigado por toda disponibilidade.

Minha gratidão também a todos os funcionários da Faculdade de Medicina da USP, em especial a Tânia, por sempre nos ajudar quando necessário.

Aproveito para agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a CAPES pelo fomento da bolsa de mestrado durante esse período. Bolsa essa, processo nº 2018/01594-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

E por fim, mas não menos importante, minha gratidão aos membros dessa banca. Saiba que vocês são grandes inspirações para mim, leio os seus artigos desde o meu primeiro dia no laboratório, e é uma grande honra ter vocês comigo nesse momento tão especial.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos participantes (N = 12).....	44
Tabela 2 - Percepção subjetiva de esforço (PSE) imediatamente após o 1-km contrarrelógio (N=12).....	45
Tabela 3 - Frequência cardíaca (FC) durante 1-km contrarrelógio (N=12).....	46
Tabela 4 - Análises sanguíneas durante 1-km contra relógio nas sessões principais (N=12).....	47
Tabela 5 - Efeitos colaterais relatados após a suplementação de placebo ou bicarbonato de sódio na escala de 0 - 10 (N=12).....	48
Tabela 6 - Recordatório alimentar dos participantes 24h antes das sessões principais (N=12).....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho do estudo cross-over (A) e desenho das sessões principais do projeto (B).....	35
Figura 2 - Tempo para completar 1 km contra-relógio na sessão bicarbonato de sódio (SB) e sessão placebo (PL).....	45
Figura 3 - Expressão gênica para MCT1 (Painel A), MCT4 (Painel B) e NHE (Painel C).....	51
Figura 3 – pH muscular no repouso, 90 minutos após a suplementação e imediatamente pós exercício nas sessões bicarbonato de sódio (SB) e sessão placebo (PL)...	52
Figura 4 – Capacidade tamponante muscular no repouso, 90 minutos após a suplementação e imediatamente pós exercício nas sessões bicarbonato de sódio (SB) e sessão placebo (PL).....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Alterações metabólicas durante o exercício físico.....	20
2.2 Balanço ácido-base do organismo.....	21
2.3 Transportadores monocarboxilato.....	22
2.4 Suplementação de bicarbonato de sódio.....	25
2.5 Suplementação de bicarbonato de sódio no exercício físico.....	28
3 OBJETIVOS.....	32
4 NOVIDADES DO ESTUDO.....	33
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1 Seleção da amostra.....	34
5.2 Desenho experimental.....	34
5.3 Teste incremental em ciclo ergômetro.....	37
5.4 Contrarrelógio de 1-km.....	37
5.5 Questionário de efeitos colaterais.....	38
5.6 Biópsia muscular por agulha de sucção.....	38
5.7 Análises sanguíneas de pH, bicarbonato e lactato.....	40
5.8 Determinação da expressão de proteínas MCT1 e MCT4 por Western Blotting.....	40
5.9 Extração do RNA e expressão gênica – PCR em tempo real (RT-qPCR).....	41
5.10 Análises musculares de pH.....	43
5.11 Avaliação da ingestão dietética.....	43
5.12 Análise estatística.....	44
6 RESULTADOS.....	45
6.1 Características dos participantes.....	45
6.2 Tempo para completar 1 km contrarrelógio.....	45
6.3 Percepção subjetiva de esforço.....	46
6.4 Frequência cardíaca.....	46
6.5 pH, lactato e bicarbonato sanguíneo.....	47
6.6 Efeitos colaterais da suplementação.....	48
6.7 Expressão proteica do MCT1 e MCT4.....	49
6.8 Expressão gênica do MCT1 e MCT4.....	49

6.9 Capacidade tamponante muscular e pH muscular.....	52
6.10 Recordatório alimentar.....	54
7 DISCUSSÃO.....	54
8 CONCLUSÃO.....	59
9 PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO.....	60
9.1 Descrição de atividades até o momento e cronograma de execução.....	60
9.2 Disseminação dos resultados.....	61
10 ATIVIDADES ACADÊMICAS.....	62
10.1 Artigos publicados.....	62
10.2 Artigos aceitos para publicação.....	63
10.3 Resumos expandidos publicados em anais de congressos.....	64
10.4 Resumos publicados em anais de de congressos.....	65
10.5 Premiações.....	67
10.6 Participações em outros projetos.....	68
11 ANEXOS.....	69
11.1 ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética para Estudos Científicos com Humanos.....	69
11.2 ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do Estudo..	73
11.3 ANEXO C – Questionário de Avaliação de Efeitos Colaterais à Suplementação de Bicarbonato de Sódio.....	76
11.4 ANEXO D – Declaração de Conclusão de Disciplinas e Respectivas Notas.....	77
11.5 ANEXO E - Declaração de Fechamento do Laboratório Devido a Pandemia da COVID-19.....	78
11.6 ANEXO F -Prêmio 2021 GSSI-ACSM Young Investigator in Sports Nutrition Award.....	79
11.7 ANEXO G -Resultados preliminaries de Western Blotting.....	80
12 REFERÊNCIAS.....	82

RESUMO

A estratégia de suplementação de bicarbonato de sódio possui um corpo robusto de evidências científicas que demonstram seu efeito ergogênico na melhora da capacidade de exercício e rendimento. Isso é explicado pelo fato de que a ingestão oral de bicarbonato de sódio provoca um aumento nas concentrações de bicarbonato sanguíneas e exerce um efeito de tamponamento extracelular durante o exercício físico, devido ao aumento do efluxo de íons de hidrogênio (H^+) de fora do músculo para a o sangue, onde consegue ser tamponado pelo bicarbonato e conseqüentemente reduzindo a acidose muscular. O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações da atividade de transportadores relacionados a esse efluxo de H^+ (MCT1 e MCT4) gerado pela suplementação aguda de bicarbonato de sódio e o subseqüente efeito no rendimento esportivo. Para isso participaram 12 homens saudáveis (idade 24 anos \pm 2; altura 1,78m \pm 0,05 e peso corporal 84,9 kg \pm 13,5), que ao laboratório em duas familiarizações e duas visitas principais distintas para um estudo duplo-cego, controlado por placebo, randomizado. Os participantes foram suplementados com dose aguda de 0,3g/kg de bicarbonato de sódio ou placebo (Farmácia Analítica, Brasil) em cápsulas gelatinosas opacas. Uma hora antes da suplementação foi coletada amostra sanguínea para subseqüente análise na gasometria e foi realizada a primeira biópsia muscular. A segunda biópsia muscular foi realizada 90 minutos pós suplementação e antes do aquecimento para o teste físico juntamente com novas coletas sanguíneas. Por fim, imediatamente após o teste foi realizado a terceira biópsia muscular e novas coletas sanguíneas. Nos momentos antes da suplementação e 90 minutos após, foi aplicado um questionário para avaliação dos efeitos colaterais associados à suplementação de bicarbonato de sódio. Os resultados desse estudo mostram que a suplementação de bicarbonato de sódio não foi capaz de melhorar o desempenho esportivo no teste de 1-km contrarrelógio comparado ao grupo placebo, inclusive

reduzindo o desempenho esportivo ($P = 0.90$). A suplementação de bicarbonato de sódio promoveu uma alcalose pré-exercício ($P = 0.0001$), mas isso, não foi associado a melhora do rendimento esportivo. As análises subsequentes mostraram nenhuma diferença na frequência cardíaca média ($P=0.44$), frequência cardíaca máxima ($P=0.11$), percepção subjetiva de esforço ($P=0.133$), expressão gênica do MCT1 ($P=0.7009$) e MCT4 ($P=0.9939$) e capacidade tamponante muscular ($P=0.9943$) entre o grupo bicarbonato de sódio e placebo. Em conclusão, a suplementação de bicarbonato de sódio promoveu uma alcalose pré exercício, mas isso não foi associado à melhoras no rendimento esportivo e mudanças fisiológicas e moleculares que justifiquem seu efeito ergogênico.

Palavras-chave: bicarbonato de sódio; suplementação; íons de hidrogênio; performance

ABSTRACT

The sodium bicarbonate supplementation has strong scientific evidence that show its ergogenic effect in improving exercise capacity and performance. This is explained by the fact that oral ingestion of sodium bicarbonate causes an increase in blood bicarbonate concentrations and exerts an extracellular buffering effect during physical exercise, due to increased efflux of hydrogen ions (H^+) from the muscle to the blood, where it can be buffered by bicarbonate and consequently reducing muscle acidosis. The aim of this study was to evaluate the changes in the activity of transporters related to this efflux of H^+ (MCT1 and MCT4) generated by acute sodium bicarbonate supplementation and the subsequent effect on sports performance. For this, 12 healthy men (age 24 years \pm 2; height 1.78m \pm 0.05 and body weight 84.9 kg \pm 13.5) participated, who went to the laboratory in two familiarizations and two separate main visits for a double blinded, placebo-controlled, randomized study. Participants were supplemented with an acute dose of 0.3 g/kg of sodium bicarbonate or placebo (Farmácia Analítica, Brazil) in opaque gelatin capsules. One hour before supplementation, a blood sample was collected for subsequent analysis in blood gases and the first muscle biopsy was performed. The second muscle biopsy was performed 90 minutes after supplementation and before warming up for the physical test together with new blood collections. Finally, immediately after the test, a third muscle biopsy and new blood collections were performed. In the moments before supplementation and 90 minutes after, a questionnaire was applied to assess the side effects associated with sodium bicarbonate supplementation. The results of this study show that sodium bicarbonate supplementation was not able to improve sports performance in the 1-km time trial compared to the placebo group, including reducing sports performance ($P = 0.90$). Sodium bicarbonate supplementation promoted a pre-exercise alkalosis ($P = 0.0001$), but this was not associated with improved sports

performance. Subsequent analyzes showed no difference in mean heart rate ($P=0.44$), maximum heart rate ($P=0.11$), subjective perceived exertion ($P=0.133$), gene expression of MCT1 ($P=0.7009$) and MCT4 ($P=0.9939$) and muscle buffering capacity ($P=0.9943$) between the sodium bicarbonate and placebo groups. In conclusion, sodium bicarbonate supplementation promoted a pre-exercise alkalosis, but this was not associated with improvements in sports performance and physiological and molecular changes that justify its ergogenic effect.

Keywords: sodium bicarbonate; supplementation; hydrogen ions; performance

1 INTRODUÇÃO

O bicarbonato de sódio é um agente tampão que foi pesquisado durante a maior parte de um século (Dennig et al., 1931) e é considerado um auxiliar ergogênico eficaz capaz de melhorar o desempenho do exercício devido ao seu efeito sobre a homeostase do pH muscular. A suplementação aguda aumenta os níveis circulantes de bicarbonato, aumentando posteriormente a taxa de efluxo de íons de hidrogênio (H^+) fora do músculo (Mainwood and Worsley-Brown, 1975), facilitada pelo co-transporte de H^+ e lactato por transportadores de monocarboxilato (MCTs) (Bonen et al., 2000, Bonen, 2001). A suplementação de bicarbonato de sódio pode levar a ganhos de exercício limitados pela acumulação de H^+ (por exemplo, durante o exercício de alta intensidade), embora também possa ter relevância clínica (Navaneethan et al., 2009).

Os efeitos do bicarbonato de sódio no exercício foram amplamente pesquisados, indicando que uma dose de $0,3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BM}$ resulta em uma melhoria no desempenho do exercício (Carr et al., 2011). No entanto, a evidência permanece equívoca, já que numerosos estudos não relataram nenhum efeito sobre o exercício teoricamente limitado pela acidose muscular (Driller et al., 2013, Higgins et al., 2013, Horswill et al., 1988, Katz et al., 1984, Linderman et al., 1992, Saunders et al., 2014). Fato é, que atualmente é visto uma grande variabilidade nas respostas físicas à suplementação de bicarbonato de sódio. Estudos prévios mostraram que a ingestão de bicarbonato de sódio resultou em alcalose antes do exercício em todos os participantes em todas as sessões (Froio de Araujo Dias et al., 2015). Porém, os parâmetros de sangue pré-exercício não explicaram a falta de um efeito ergogênico mostrado no estudo, uma vez que estes foram sempre aumentados antes do exercício, sugerindo que o mecanismo para uma capacidade de

exercício melhorada estava em vigor antes de cada exercício. Nós especulamos que isso pode ser devido a uma variabilidade na atividade da proteína transportadora de monocarboxilato (MCT) após suplementação de bicarbonato e à taxa em que H^+ é removido da célula de trabalho. No entanto, nenhum estudo até o momento determinou diretamente o efeito do aumento do bicarbonato circulante na atividade MCT após suplementação de bicarbonato de sódio.

De fato, nenhum estudo demonstrou a relação entre as concentrações de H^+ e lactato muscular e sanguíneo em resposta a suplementação de bicarbonato de sódio, mesmo esse sendo o principal mecanismo de ação discutido na maioria dos artigos científicos. Logo, essa lacuna nas pesquisas que procuram explicar o mecanismo do efeito do bicarbonato de sódio no exercício físico necessita ser preenchida, desde que a relação entre essa investigação está diretamente ligada com o principal mecanismo de ação do bicarbonato de sódio evidenciado até hoje, sendo esse, o aumento do efluxo de H^+ e lactato para fora do músculo.

Embora a pesquisa sobre a suplementação de bicarbonato de sódio tenha ocorrido há várias décadas, permanecem algumas questões-chave de mecânica quanto à sua eficácia no desempenho do exercício. Portanto, este estudo tem como objetivo colmatar essas lacunas e investigar em um nível individual e fisiológico por que alguns indivíduos podem se beneficiar, ou não, da suplementação de bicarbonato de sódio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALTERAÇÕES METABÓLICAS DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO

Alguns fatores fisiológicos possuem comprovação científica suficiente para estarem associados ao processo de fadiga muscular durante o exercício físico. Dentre eles, vale destacar a redução na concentração sanguínea de sódio, que pode ser independente ou associada a desidratação (James et al., 2017). Vale salientar que a perda de peso a partir de 2% do peso corporal em decorrência da perda hídrica pode provocar alterações associadas a redução do rendimento esportivo, incluindo a fadiga muscular (Nuccio et al., 2017). Esse processo pode ser agravado em exercícios em ambientes mais quentes. Ainda sobre isso, dois fatores envolvendo o músculo esquelético também podem estar associados a fadiga muscular, um deles é a depleção de glicogênio muscular sem o subsequente ajuste de carboidratos exógenos (Jeukendrup, 2004). O conteúdo de fosfocreatina também exerce uma função extremamente importante na atenuação da fadiga muscular. A redução no conteúdo da fosfocreatina durante sessões repetidas de treino também favorece para esse fenômeno (Burke and Hawley, 2018).

Além disso, a demanda para produção de adenosina trifosfato (ATP) através da predominância da via glicolítica anaeróbia durante o exercício físico de alta intensidade provoca a produção de alguns metabólitos no músculo esquelético, como por exemplo, o lactato e o H^+ (Gaitanos et al., 1993). O acúmulo de H^+ é uma das principais hipóteses evidenciada pela literatura científica para explicar a redução do pH intramuscular e sanguíneo, e conseqüentemente, aumentando a acidose muscular, fator que predispõe a fadiga. Além da redução do pH intramuscular, o que é um dos fatores mais discutidos, a acidose muscular também está associadas a redução da atividade de enzimas glicolíticas, como por exemplo, a fosfofrutoquinase. Essas enzimas estão diretamente relacionadas a redução na produção muscular de energia, além disso, estão diretamente associadas à

redução do processo de contração muscular. Por fim, outro fator que a acidose promove negativamente no rendimento esportivo é a redução do processo contrátil do músculo esquelético. Todos esses fatores em conjunto corroboram para o processo de fadiga muscular, e conseqüentemente, interrompendo a realização do exercício em alta intensidade (Fitts, 1994).

Contudo, o desequilíbrio ácido-base ocasionado por situações como o exercício físico, supre a capacidade tamponante fisiológica do nosso organismo, sendo necessário estratégias de suplementação para otimizar esse processo de tamponamento, e conseqüentemente, provocando a manutenção do balanço ácido-base a fim de evitar os efeitos negativos provocados por esse desequilíbrio.

2.2 BALANÇO ÁCIDO-BASE DO ORGANISMO

A regulação do equilíbrio ácido-base é caracterizada pelo conjunto de ações no organismo para a manutenção das concentrações de H^+ nos diferentes fluidos corporais. Fato é que alterações nessas concentrações geram alterações nas atividades biológicas das células, por isso, se torna extremamente relevante para o organismo a manutenção e o controle ácido-base. Essas alterações são explicadas principalmente pelo forte campo elétrico ao redor do H^+ , o que lhe compete uma característica de grande reatividade, ou seja, uma alta capacidade de reagir com outras moléculas seja quimicamente ou eletricamente. Portanto, devido essa alta reatividade, pequenas alterações na concentração desse próton pode alterar principalmente as funções terciárias e quaternárias de algumas proteínas, e conseqüentemente, provocando mudanças nas suas alterações fisiológicas (Boron and Boulpaep, 2015).

Pensando nisso, existem tampões fisiológicos que corroboram para esse balanço ácido-base do organismo. Basicamente, essas ações são moldadas por tamponantes intra e extracelular, que envolvem principalmente os rins e o pulmão. Em situação fisiológica, ou seja, sem a inserção do exercício físico, o organismo é submetido a uma carga de aproximadamente 70 mmol/dia provenientes principalmente da alimentação. Essa carga de ácido fixo adicionada é tamponada principalmente pelo bicarbonato extracelular. Com isso, o papel dos rins nessa manutenção fisiológica é extremamente necessário, tendo em vista a reabsorção do bicarbonato filtrado e a produção do novo bicarbonato são dependentes deste órgão (Musa-Aziz, 2017).

2.3 TRANSPORTADORES MONOCARBOXILATO

Como introduzido anteriormente, durante o exercício físico, principalmente aqueles com característica de alta contribuição da via glicolítica anaeróbia, existe a produção de metabólitos em resposta à necessidade de produção de energia. Dois desses metabólitos produzidos são os íons de hidrogênio e lactato (Robergs et al., 2004). Esses metabólitos possuem a capacidade de serem transportados passivamente pelo sarcolema, ou seja, quando existe a necessidade de um transporte do músculo para o sangue ou vice-versa, é necessária a ação de intermediadores, no caso, os transportadores monocarboxilatos (MCTs) (Messonnier et al., 2007). Os transportadores monocarboxilatos são proteínas que possuem a capacidade de transportar não apenas o H^+ e o lactato, mas também, corpos cetônicos, cetoácidos e piruvato. Atualmente, existem diversas isoformas desses transportadores, porém, associados ao músculo esquelético, as principais isoformas são o MCT1 e MCT4.

Algumas características diferem essas duas isoformas. O MCT1 é encontrado principalmente em fibras musculares oxidativas, também chamadas de fibras do tipo 1.

Enquanto o MCT4 é encontrado principalmente nas fibras do tipo 2, com características glicolíticas. Ambos transportadores realizam o efluxo de metabólitos através das membranas celulares em uma relação de 1:1 (Pilegaard et al., 1994).

A principal função do MCT1 é captar o lactato que está na corrente sanguínea para ser transportado até o miócito, onde pode ser utilizado como substrato energético. O MCT4 possui como principal característica justamente o papel contrário. Visando a atenuação da acidose muscular, ou seja, evitando o acúmulo de H^+ dentro das células musculares, ocorre principal ação do MCT4, no qual transporta o lactato e o H^+ de dentro do músculo para a corrente sanguínea (Juel, 2001).

Existe algumas informações conflitantes na literatura científica no que diz a respeito da influência do treinamento na expressão desses transportadores. Parece que o treinamento aeróbio crônico a 75% do VO_{2max} durante 9 semanas, pode aumentar a expressão do MCT1 em até 78%, porém, não teve nenhum efeito sobre a expressão do MCT4 (Dubouchaud et al., 2000). Por outro lado, o exercício de força provocou um aumento nas expressões do MCT4 nas células musculares em homens saudáveis (Juel et al., 2004).

Fato é que quando o H^+ e lactato é transportado de dentro do músculo para a corrente sanguínea via MCT4, grande parte do lactato é captado através do MCT1 pelos músculos oxidativos, coração e hemácias (Bonen et al., 2000). Os íons de hidrogênio quando são transportados para a corrente sanguínea podem ser tamponados pelo bicarbonato sanguíneo, dando origem ao ácido carbônico e posteriormente sendo dissociado em água e dióxido de carbono (Robergs et al., 2004).

O mecanismo de ação e o grau de transportes desses metabólitos são altamente associados a expressão dos MCT1 e MCT4. Alguns estudos sugerem que o aumento da concentração sanguínea de bicarbonato de sódio exerceria um ação no aumento da

expressão e atividade desses transportadores, e conseqüentemente, melhoraria o rendimento esportivo (Rothschild and Bishop, 2020). Porém, nenhum estudo até o momento investigou o real efeito da suplementação de bicarbonato de sódio no comportamento desses transportadores. Esse será um dos principais pontos investigados nesse estudo.

Polimorfismos nos genes que codificam os MCTs podem influenciar a expressão desses transportadores e a resposta de um indivíduo ao exercício (Heibel et al., 2018). A frequência do alelo T se difere entre atletas de diferentes modalidades, sugerindo que esse polimorfismo tem uma influência importante no desempenho do exercício (Ben-Zaken et al., 2015, Sawczuk et al., 2015). O polimorfismo A1470T do gene que codifica MCT1 resulta na substituição de aminoácidos da proteína transportadora, o que pode ser funcionalmente importante, visto que a modificação na estrutura pode prejudicar a capacidade de transporte de Lac^-/H^+ (Cupeiro et al., 2012). Indivíduos homozigotos TT tem o transporte reduzido de lactato, e apesar das diferenças no efluxo de Lac^-/H^+ , não existe qualquer discrepância com heterozigotos AT nos valores de VO_2max e força máxima (Pasqua et al., 2016). Embora existam variações genéticas do gene MCT4 (Lean and Lee, 2012), nenhum estudo investigou a relevância de quaisquer polimorfismos no efluxo de Lac^-/H^+ e seu efeito no desempenho do exercício físico. É mais do que provável que diferenças genótípicas no MCT4 possam levar a uma atividade alterada que pode impactar o efluxo de Lac^-/H^+ , afetando o desempenho do exercício. Novos estudos tem observado uma influência dos polimorfismos no próprio rendimento esportivo, como por exemplo, um estudo publicado recentemente que investigou a influência do polimorfismo no MCT1 em sprints repetidos. Para isso, vinte seis homens, jogadores de futebol italiano, foram recrutados para avaliar as características genéticas a partir da técnica de PCR. Os

resultados mostraram que a carregadores do alelo A, estavam associados a menor tempo nos sprints repetidos, impactando na performance esportiva (Massida et al., 2021).

Uma revisão recente, deu mais ênfase nesse assunto, discutindo os efeitos dos polimorfismos no MCT1 no rendimento esportivo de testes de alta intensidade. Nessa revisão foi discutido os efeitos moleculares do MCT1 no equilíbrio ácido-base durante o exercício, e principalmente o papel mediador do lactato produzido pelas células musculares. Nesse estudo, os autores observaram que a presença de polimorfismos no MCT1 tem uma grande prevalência na Espanha comparado a outros países do mundo. Porém, os autores concluem que existe pouca evidência científica para uma associação entre o polimorfismo e a performance em testes wingate (Piscina-Viúdez et al., 2021).

2.4 SUPLEMENTAÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO.

O sistema tampão bicarbonato é o principal tamponante fisiológico. Baseado nisso, diversos estudos evidenciaram efeitos positivos da suplementação de bicarbonato de sódio sobre o tamponamento sanguíneo e a subsequente melhora do rendimento esportivo principalmente em exercícios de 60 segundos a 5 minutos em alta intensidade (Horswill, 1995).

A melhora no desempenho esportivo em resposta à suplementação de bicarbonato de sódio acontece principalmente pelo seguinte mecanismo: após a ingestão oral de bicarbonato de sódio, o mesmo se dissocia no estômago em sódio e bicarbonato. O bicarbonato, por si, é absorvido ao longo do jejuno, e posteriormente, tem sua concentração aumentada na corrente sanguínea, em proporção relativa à dose suplementada (Siegler et al., 2016).

Sabido que o exercício físico de alta intensidade é capaz de produzir exarcebadamente lactato e H^+ , o aumento das concentrações sanguíneas de bicarbonato

parece facilitar o efluxo de lactato e H^+ de dentro do músculo para o sangue, através da ação de transportadores monocarboxilato (MCTs), sendo assim, evitando o acúmulo de H^+ intramuscular, atenuando a acidose muscular, ou seja, o pH do músculo reduz mais lentamente, atardando as alterações metabólicas e sintomas de esforço que contribui para a fadiga muscular. Um estudo tradicional investigou justamente o mecanismo de ação da suplementação de bicarbonato de sódio sobre os valores de pH muscular, mensurado através da realização de biópsia muscular. Após submeterem os voluntários a um teste físico de alta intensidade no cicloergômetro, foi visto que o pH muscular após a fadiga era maior no grupo suplementado em comparação ao grupo placebo, 6.81 e 6.73 respectivamente (Costill et al., 1984). Além disso, a suplementação de bicarbonato de sódio é capaz de provocar outras mudanças no metabolismo muscular durante o exercício físico, como por exemplo, o aumento da capacidade do músculo de produzir lactato, o que está associado a maior capacidade do músculo de produzir ATP em exercícios na qual a via glicolítica anaeróbia é predominante (Bouissou et al., 1988). Fato esse, que refuta a hipótese da produção de lactato ser um fator causal para a fadiga muscular, enquanto pesquisas atuais demonstram que isso está associado ao rendimento esportivo (Hall et al., 2016).

Além das alterações musculares, a suplementação de bicarbonato de sódio também provoca mudanças à nível sanguíneo. Diversos estudos mostram que após a ingestão oral de bicarbonato de sódio, ocorre um aumento nos valores de pH e bicarbonato sanguíneo (Jones et al., 2016). No âmbito esportivo, essa mudança no comportamento dos valores de pH e bicarbonato estão associados à melhora do desempenho esportivo, tendo em vista que, indivíduos submetidos ao esforço físico, performam melhor quando há uma amenização na queda do pH sanguíneo e quando os indivíduos iniciam o exercício com

valores mais altos de bicarbonato na concentração, comportamentos esses que são observados após a ingestão oral de bicarbonato de sódio (McNaughton et al., 2008).

O protocolo de suplementação de bicarbonato de sódio já é amplamente investigado e possui um padrão estabelecido pela literatura. Embora, o modelo crônico estabelecido por Lars McNaughton e colaboradores (1999) através da ingestão de 500 mg/kg por dia, fracionados ao longo do dia em doses menores, por um período mínimo de 5 dias forneça efeitos tamponantes por até dois dias após o fim da suplementação, o modelo mais utilizado é a suplementação aguda de uma única dose de aproximadamente 300 mg/kg. A maioria dos estudos investigando efeitos da suplementação de bicarbonato de sódio utiliza esse protocolo agudo em um período de 90 a 120 minutos que antecedem o teste físico (Carr et al., 2011). Fato é que atualmente é encontrado uma grande variação nas respostas individuais à suplementação de bicarbonato de sódio como estratégia ergogênica, ou seja, estratégia visando melhora no desempenho esportivo (Jones et al., 2016). Uma vez que os estudos historicamente empregaram protocolos padronizados em que a ingestão ocorre em um tempo pré-determinado antes do exercício, é improvável que todos os indivíduos realizem exercícios no momento correspondente ao bicarbonato circulante pico. Um recente estudo avaliou as respostas individuais de homens saudáveis até 4 horas após a ingestão de 300 mg/kg de bicarbonato de sódio e mostrou que o que se acreditava anteriormente, que existiria um pico de concentração sanguínea de bicarbonato após 90 a 120 minutos após a ingestão, porém, foi observado que existe pouca variação entre 90 minutos até 240 minutos (de Oliveira et al., 2020). No entanto, nenhum estudo até o momento determinou se a magnitude na mudança no bicarbonato de sangue e no pH está relacionada à magnitude da mudança no desempenho do exercício. Os resultados desse estudo fornecerão informações sobre a relação entre os aumentos no bicarbonato com suplementação SB e seu impacto direto no desempenho subsequente do exercício.

Contudo, ainda com essas descobertas, a suplementação de bicarbonato de sódio possui uma pequena aplicabilidade clínica devido a prevalência de efeitos colaterais, sendo os mais relatados: desconfortos gastrointestinais, náuseas, vômitos, dores de cabeça e sensação de mal estar. Atualmente, algumas pesquisas são direcionadas para estratégias que visam atenuar os efeitos adversos da suplementação de bicarbonato de sódio enquanto mantém suas propriedades ergogênicas. Sem dúvidas, essa é uma linha de pesquisa com grandes perspectivas e mais estudos nessa temática são necessários para garantir a efetividade dessas estratégias estudadas.

2.5 SUPLEMENTAÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO NO EXERCÍCIO FÍSICO

Tendo em vista os efeitos adversos da acidose muscular no exercício físico, a suplementação de bicarbonato de sódio tem sido amplamente investigada devido ao seu possível efeito ergogênico.

Os efeitos do bicarbonato de sódio no exercício foram pesquisados com dados meta-analíticos, indicando que uma dose de $0,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{BM}$ resulta em uma melhoria de $1,7 \pm 2,0\%$ no desempenho do exercício (Carr et al., 2011). No entanto, a evidência permanece equívoca, já que como relatado na introdução, numerosos estudos não relataram nenhum efeito sobre o exercício teoricamente limitado pela acidose muscular. No entanto, é apenas uma evidência recente e emergente que está nos ajudando a entender os mecanismos contribuintes para essa variabilidade. A relação entre a dose e o grau de alcalose do sangue após a ingestão de bicarbonato de sódio tem sido sugerida para os resultados apresentados (Matson and Tran, 1993) e a grande variabilidade no pH do sangue e as respostas de bicarbonato à suplementação podem ter contribuído para uma grande variação nas respostas. Recentemente, dados apresentados pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou uma grande variabilidade interindividual no bicarbonato de sangue

horário após a ingestão de bicarbonato de sódio que variou de 75 a 180 minutos (Jones et al., 2016).

Estudos prévios mostraram que a ingestão de bicarbonato de sódio resultou em alcalose antes do exercício em todos os participantes em todas as sessões (Froio de Araujo Dias et al., 2015). Porém, os parâmetros de sangue pré-exercício não explicaram a falta de um efeito ergogênico mostrado no estudo, uma vez que estes foram sempre aumentados antes do exercício, sugerindo que o mecanismo para uma capacidade de exercício melhorada estava em vigor antes de cada exercício. Uma vez que os aumentos absolutos no pH do sangue, o excesso de bicarbonato e de base antes do exercício foram extremamente semelhantes entre todos os ensaios de bicarbonato de sódio, pode ser, portanto, que um indivíduo nem sempre possa usar plenamente essa alcalose de sangue e capacidade de tamponamento melhorada. Nós especulamos que isso pode ser devido a uma variabilidade na atividade da proteína transportadora de monocarboxilato (MCT) após suplementação de bicarbonato de sódio e à taxa em que H^+ é removido da célula de trabalho.

A hipótese da relação entre os aumentos na circulação sanguínea de bicarbonato com os MCTs até hoje sustentam a explicação de resultados positivos no exercício físico em resposta à suplementação de bicarbonato de sódio (Lancha Junior et al., 2015). Porém, até a presente data, não há nenhum estudo que investigou o real efeito do bicarbonato no comportamento dos MCTs.

Tendo em vista essa variação nas respostas a suplementação de bicarbonato de sódio, uma recente revisão da literatura buscou discutir fatores que poderiam estar associado a essas diferenças nos resultados. Dentre os principais parâmetros discutidos, foi destacado a necessidade de uma dose suplementada de bicarbonato de sódio suficiente para aumentar aproximadamente 6 mmol/L nas concentrações sanguíneas, para que entre em

uma zona de grande probabilidade de efeito ergogênico. Embora estudos recentes refutam a hipótese de que o pico de bicarbonato na corrente sanguínea acontece de 90 até 120 minutos após a ingestão, o tempo de suplementação, parece ser um fator que pode influenciar na resposta, principalmente, se a suplementação anteceder os 90 minutos do início do exercício físico. Além disso, outros fatores individuais, como por exemplo, estado de treinamento, modalidade esportiva e prevalência de efeitos colaterais podem estar associados à resposta da suplementação de bicarbonato de sódio. Por fim, peculiaridades genéticas, principalmente em genes associados aos MCTs, pode ser um dos principais fatores que explicam a efetividade ou não da mesma dose de bicarbonato suplementada para diferentes indivíduos (Heibel et al., 2018). Cada vez mais, estudos buscam relacionar lacunas em relação aos MCTs com uma possível associação as resposta esportivas da suplementação de bicarbonato de sódio.

Fato é que, ainda assim, existem comprovações científicas da melhora no rendimento esportivo através da suplementação de bicarbonato de sódio, tanto que, o bicarbonato de sódio é considerado nível A de evidência científica em relação a sua efetividade e segurança (Maughan et al., 2018). Novamente, os efeitos ergogênicos do bicarbonato de sódio parece ser visto em exercícios com no mínimo 60 segundos e no máximo 5 minutos de duração, ou seja, exercício de alta intensidade e curta duração (Horswill, 1995). Porém, o que é visto na literatura é um variação nas respostas. Algumas revisões investigam esses pontos de discussão em relação aos benefícios da suplementação de bicarbonato de sódio em diferentes modalidades de exercício. Para completar esse assunto, foi publicado recentemente, uma revisão sistemática e meta-análise que analisa o efeito da suplementação de bicarbonato de sódio em exercícios de longa duração e exercício de força. Após a análise estatística, os resultados obtidos baseados em outros estudos totalizando o 113 sujeitos investigados foi que a suplementação de bicarbonato possui um significativo

efeito na melhora do rendimento esportivo em exercícios endurance, tanto em grupos musculares pequenos e grandes, por outro lado, esse efeito não é visto em estudos com 110 participantes seguindo protocolos de exercício de força (Grgic et al., 2020).

Recentemente, foi publicado por membros do nosso grupo de pesquisa uma revisão sistemática e meta-análise a respeito de suplementos tamponantes extracelulares e o desempenho esportiva. Os principais achados desse estudo foi que de fato, os agentes tamponantes são efetivos para melhora do rendimento esportivo, com grande destaque para o bicarbonato de sódio, como o suplemento extracelular mais efetivo para a melhora do desempenho esportivo de alta intensidade e curta duração, principalmente quando existe um aumento >4 mmol/L de bicarbonato da corrente sanguínea após a suplementação (De Oliveira et al., 2021).

Portanto, a suplementação de bicarbonato de sódio parece gerar efeitos positivos na melhora do rendimento esportivo, principalmente em exercícios de alta intensidade e curta duração. Isso acontece, devido ao efeito de tamponamento sanguíneo que o bicarbonato exerce, atenuando o acúmulo de H^+ intramuscular, e conseqüentemente, atardando a acidose muscular, fator esse que predispõe a fadiga durante o exercício. A hipótese de que essa melhora no rendimento esportivo é provocada por alterações no comportamento dos transportadores de H^+ ainda é perdurada pela ciência, embora nenhum estudo tenha avaliado de fato os efeitos da suplementação sobre esses transportadores.

Diante dessas evidências, esse estudo teve como objetivo analisar as respostas sanguíneas e musculares, incluindo o comportamento dos transportadores monocarboxilatos em resposta à suplementação de bicarbonato de sódio e o subsequente desempenho esportivo em indivíduos submetidos a um teste de 1 quilômetro contra-relógio.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas agudas sanguíneas e musculares a uma dose de 0,3g/kg de bicarbonato de sódio ou placebo, e seu subsequente efeito sobre o exercício de alta intensidade.

Os objetivos específicos do estudo estão descritos a seguir:

- 1) Este estudo determinou se os aumentos de bicarbonato na corrente sanguínea refletem diretamente em melhorias no desempenho do exercício.
- 2) Esse estudo determinou a extensão das alterações no sangue e capacidade tamponante muscular após suplementação de bicarbonato de sódio e exercício.
- 3) Determinou a relação entre a magnitude da alteração no bicarbonato de sangue e o conteúdo e a expressão dos transportadores MCT1 e MCT4.

4 NOVIDADES DO ESTUDO

O objetivo de todo o projeto foi identificar os principais fatores mecanicistas que contribuem para uma grande variabilidade observada na resposta individual à suplementação nutricional. As novidades individuais do estudo atual são as seguintes:

1. Demonstrar a extensão da relação entre aumentos no bicarbonato de sangue com suplementação de SB e desempenho de exercícios. Isso proporcionará uma visão importante sobre se a medição da concentração aumentada de bicarbonato é uma medida apropriada de capacidade tamponante aumentada.
2. A associação entre o metabolismo do sangue e do músculo com suplementação de bicarbonato de sódio ainda é pouco evidenciada. O estudo forneceu dados que corroborem ou refutem que o aumento dos metabolitos sanguíneos após o exercício é devido ao aumento do transporte para fora do músculo em funcionamento.
3. Nenhum estudo até o momento determinou se as mudanças no bicarbonato de sangue influenciam diretamente o conteúdo e a expressão dos transportadores MCT. Isso é surpreendente, pois este é o principal mecanismo proposto pelo qual o teor de bicarbonato de sódio é teorizado para melhorar a capacidade de exercício. Assim, este estudo preencheu essa lacuna e determinou a força dessa associação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Seleção da Amostra

Quinze voluntários (homens e fisicamente ativos, que realizavam exercício físico pelo menos três vezes na semana, com idade mínima de 21 anos e máxima de 26 anos) foram recrutados para participação no estudo. Durante o período de coleta de dados, três voluntários precisaram ser retirados do estudo (motivos de acidentes pessoais e rejeição pelo método de biópsia muscular), sendo assim, totalizando doze voluntários que completaram o estudo. Como critérios de inclusão, os participantes não poderiam ter suplementado, nos últimos 3 meses, creatina, beta-alanina e cafeína. Não foram incluídos no estudo participantes: 1) tabagistas, 2) portador de alguma doença crônica, 3) com uso atual ou progresso de esteroides anabolizantes. Antes da participação no estudo, todos os voluntários preencheram um questionário para determinar que não têm qualquer problema de saúde que pode prejudicar a realização dos testes físicos. Este estudo foi submetido e aceito no Comitê de Ética da instituição (CAAE: 80621317.5.0000.5391).

5.2 Desenho Experimental

Os participantes foram recrutados a comparecer ao laboratório em 2 sessões preliminares e 2 sessões ocasiões principais separadas para um estudo duplo-cego, controlado por placebo, e randomizado. As sessões preliminares consistiam em dois momentos: 1) Teste incremental e realização de uma familiarização do contrarrelógio de 1-km. 2) Familiarização 2 do contrarrelógio de 1-km. Logo, os principais ensaios foram realizados nas duas subsequentes visitas ao laboratório: 3 e 4) Testes principais onde haverá o contrarrelógio de 1-km e coleta de sangue para análise de metabólitos. Os participantes realizaram todas as visitas no mesmo horário do dia, em um estado pós prandial de aproximadamente 2 horas controlado através da replicação de um recordatório

alimentar de 24 horas. Os participantes foram aconselhados a abster-se de álcool e exercícios físico extenuante e/ou não acostumados pelo período de 24 horas antes da respectiva visita ao laboratório, além da proibição do consumo de cafeína nos dias de teste. As conformidades desses pedidos foram questionadas verbalmente antes de cada sessão. Todos os testes foram realizados no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada e Nutrição sob a supervisão de um fisiologista treinado (Dr. Bryan Saunders), enquanto um médico (Dr. Luiz Riani) permaneceu de prontidão nas instalações da unidade, em caso de alguma emergência médica.

Após a chegada ao laboratório para as sessões principais, foi coletado amostra de sangue através do capilar e em seguida foi realizada a primeira biópsia muscular. Nesse momento, os participantes foram questionados sobre a sensação de efeitos colaterais antes da suplementação através da elaboração de um questionário. Em seguida, os participantes ingeriram uma dose aguda de 0,3g/kg de bicarbonato de sódio ou placebo (Farmácia Analítica, Brasil) em cápsulas gelatinosas opacas, sem efeito de sabor, em conjunto a 500 ml de água. Após aguardar 90 minutos sem realizar esforço físico, foi realizado a segunda biópsia muscular, além da coleta de sangue, momento este, antes do aquecimento do teste físico. Antes de ser submetido ao esforço físico, o participante respondeu novamente o questionário para avaliar a sensação de efeitos colaterais da suplementação de bicarbonato de sódio e um aquecimento padronizado, antes do teste de 1 quilômetro contra relógio. Outras amostras de sangue foram coletadas após o aquecimento de 10 minutos e imediatamente após o exercício e a última biópsia muscular foi coletada imediatamente após o exercício. Todas as amostras foram coletadas com o participante na posição vertical. As amostras de sangue coletadas foram imediatamente analisadas através de gasometria para observar o comportamento do bicarbonato e pH sanguíneo. O lactato

sanguíneo foi avaliado através de aparelho portátil Lactate Plus. As biópsias musculares foram armazenadas e posteriormente analisadas. A figura abaixo representa o desenho do estudo e particularidades das sessões (figura 1).

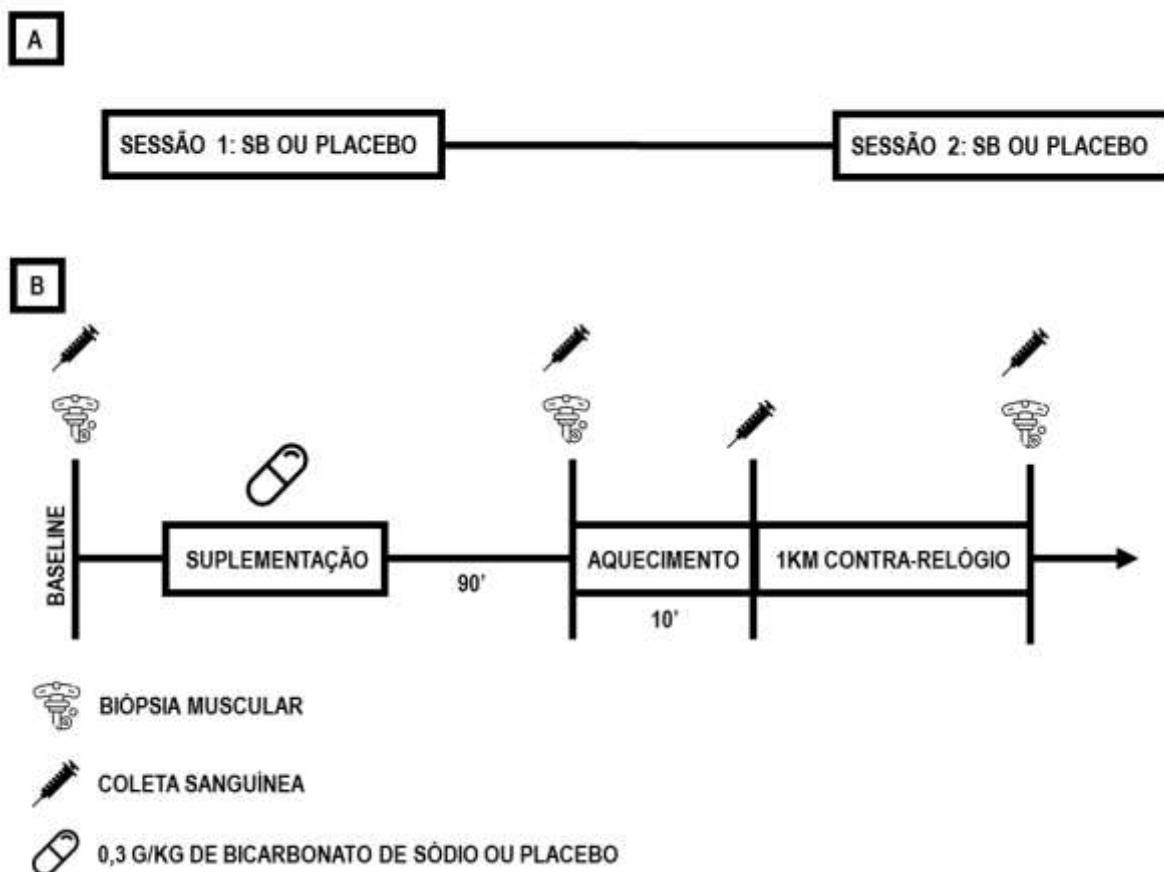


Figura 1 - Desenho do estudo cross-over (A) e desenho das sessões principais do projeto (B).

5.3 Teste incremental em ciclo ergômetro

Antes dos testes os participantes foram questionados em relação aos seus hábitos de treino semanal a fim de assegurar a segurança ao exercício. Aqueles que assinalaram incapacidade em uma ou mais questões foram excluídos do estudo. Além disso, todos os testes foram realizados enquanto um médico (Dr. Luiz Riani) permaneceu de prontidão nas instalações da unidade, em caso de alguma emergência médica.

O teste incremental foi realizado em um ciclo ergômetro (Lode Excalibur, Lode, Holanda). A carga inicial foi de 100 W e aumentou 25W a cada estágio de 3 min até a exaustão. O VO₂ e VCO₂ foram mensurados durante o todo o teste (K5, Cosmed, Itália). Ao fim do teste os dados foram refinados em intervalos de 15 segundos, e então, avaliado o primeiro e segundo maior valor (para evitar que seja erro do aparelho foi feito a conferência do primeiro e segundo maior valor em relação a discrepância entre eles) de VO₂ e adotado como medida. Todos os participantes receberam forte encorajamento verbal durante todo o teste.

5.4 Contrarrelógio de 1-km

O teste contrarrelógio de 1-km foi realizado em ciclo ergômetro (Lode – Excalibur, Groningen, Holanda). Os participantes realizaram um aquecimento de 10 minutos a uma carga padronizada de 100 W. Após isso, foram feitos os ajustes de conexão de cabos e ajustes finais no ciclo ergômetro que foi padronizado em 60 segundos, e então, realizando imediatamente o teste contrarrelógio individual de 1-km. Os participantes foram instruídos a completar o exercício no menor tempo possível. Nenhuma motivação ou informação específica foi dada exceto a cada 250 m até que o teste esteja completo. O tempo total para completar foram adotados como medida fim. Ao final do teste foi feita

a análise da percepção subjetiva de esforço (PSE), pela escala de Borg de 20 pontos, sendo 6 o esforço mínimo e 20 o máximo. Uma amostra de sangue de ponta de dedo foi coletada para avaliação da concentração de lactato em um analisador de lactato portátil (Lactate Plus, Roche Diagnostics, Basel, Suíça) imediatamente antes e imediatamente após o teste.

5.5 Questionário de efeitos colaterais

O questionário de efeito colateral foi aplicado em todos os voluntários em dois momentos distintos: 1) imediatamente em sua chegada ao laboratório; 2) 90 minutos após a suplementação. O questionário foi aplicado nas duas sessões principais do estudo. O modelo do questionário está apresentado nos anexos deste documento (anexo C).

5.6 Biópsia muscular por agulha de sucção

Os voluntários foram orientados a comparecer ao laboratório onde foi realizado o procedimento de biópsia muscular. Todas as biópsias foram realizadas por um médico treinado (Dr. Luiz Riani). Foi extraída uma pequena amostra (aproximadamente 100 mg) da porção lateral e mais volumosa do vasto lateral, cuja quantidade foi suficiente para todas as análises propostas. O local aproximado da extração foi entre o ponto médio da patela e do trocânter maior. O procedimento de biópsia muscular foi realizado a partir da utilização de uma agulha especialmente desenvolvida para extrair pequenas amostras de músculo (Bergstrom, 1975).

Para a realização do procedimento, o voluntário se manteve deitado em uma maca, mantendo os joelhos estendidos e a musculatura relaxada. O médico responsável realizou a assepsia do local e, em seguida, administrou 3 mL de xilocaína a 2% para anestésiar o

tecido. A aplicação do anestésico foi feita com agulhas hipodérmicas descartáveis e estéreis sob o tecido cutâneo. Após assepsia e anestesia, foi feita a incisão para a entrada da agulha de biópsia no tecido muscular. Para tanto, o médico responsável utilizou uma lâmina de bisturi número 11, esterilizada, individual e descartável para realização da incisão de aproximadamente 0,5 centímetros de extensão. A incisão cortou a pele e a fáscia muscular. O indivíduo não sentiu qualquer dor durante a realização deste procedimento, uma vez que não existem terminações nervosas e/ou sensíveis a dor na fáscia muscular ou mesmo no próprio músculo. A agulha de biópsia, esterilizada e de uso individual, foi então inserida pelo médico responsável através do pequeno orifício obtido com a incisão. Após uma sucção, aplicada na extremidade superior externa da agulha por uma seringa de 120 mL, um pequeno pedaço de músculo foi puxado para o interior da agulha e cortado pela sua lâmina interna. Usualmente, os voluntários relataram ausência ou uma quantidade mínima de desconforto.

Os voluntários foram sempre informados dos procedimentos que tomarão sequência, e após a retirada da agulha, foi aplicada pressão sobre o ponto de incisão para prevenir sangramento. A incisão foi então fechada com bandagem esterilizada e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento. Uma faixa foi envolvida na coxa, sobre a região onde a biópsia foi realizada, aplicando pressão contínua, a fim de evitar qualquer edema local. O voluntário foi instruído a manter a bandagem por 24 horas e a manter a incisão limpa e seca pelo período de 72 horas. As amostras foram congeladas e armazenadas a -85 °C até a liofilização, quando uma porção de músculo de cada biópsia foi dissecada de gordura, tecido conjuntivo e sangue.

5.7 Análises sanguíneas de pH, bicarbonato e lactato

A análise de gases sanguíneos foi realizada em amostras coletadas através de capilares (BD A-Line, 1 ml). As amostras foram imediatamente submetidas para determinação do pH e bicarbonato do sangue, usando um analisador automatizado de gases no sangue (Prime Plus from Nova Biomedical). Amostras de sangue foram coletadas do dedo para a avaliação imediata da concentração de lactato usando um analisador portátil de lactato (Lactate Plus, Roche Diagnostics, Basel, Suíça).

5.8 Determinação da expressão de proteínas MCT1 e MCT4 por Western Blotting

A expressão proteica dos transportadores de H⁺ (MCT1, MCT4) foi determinada pela técnica de Western Blotting, de acordo com os procedimentos a seguir. As amostras musculares foram imediatamente homogeneizadas em tampão de extração (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X100, pH 7.4). Os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos, a 12000 rpm em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar a concentração total de proteínas. Em seguida, cada amostra foi diluída em tampão Laemmli na proporção de 1:5. Trinta microgramas de proteína do sobrenadante foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), no aparelho para minigel (Mini-Protean).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente sob 100 volts para uma membrana de nitrocelulose com duração de 1 hora e 45 minutos. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi minimizada pela incubação destas com 10 ml de solução bloqueadora (5% de leite desnatado MOLICO®) por 1 hora na temperatura ambiente. Em seguida, as mesmas foram lavadas quatro vezes por cinco

minutos com solução TBS-T (solução tampão com tris e tween) seguido de mais uma lavagem de cinco minutos com solução TBS (solução com tampão fosfato) para retirada do excesso de tween. As bandas existentes nas membranas incubadas foram visualizadas por fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare®) pós-reação de quimiluminescência. O método da quimiluminescência consiste nos seguintes passos: após incubação da membrana com o anticorpo primário, a membrana é novamente incubada por uma hora e meia com o anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase em solução bloqueadora (1:10000). Em seguida, as membranas são lavadas novamente três vezes com solução TBS-T para remover o excesso de anticorpo. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (ECL, SuperSignal West Femto Chemilumininescent Substrate, Thermo Scientific®). As análises quantitativas dos blots foram realizadas por meio do programa Scion (Scion Corporation, EUA). Como normalizador utilizamos a quantificação do rastro de proteínas por meio da coloração das membranas com s – Ponceau, conforme ROMERO-CALVO et al. (2010).

5.9 Extração do RNA e expressão gênica – PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para extração do RNA, as amostras foram mantidas no nitrogênio líquido até o momento de serem homogeneizadas. Então, as amostras foram separadas em um tubo de homogeneização (4,5 ml) para cada amostra e outros 3 tubos para lavagem. A lavagem foi feita entre cada processamento das amostras na seguinte ordem:

1º: Lavagem = Trizol

2º: Lavagem = Clorifórmio

3º: Lavagem = Água DEPC

Após isso, as amostras foram homogeneizadas e colocada 1 ml de trizol/diazol. Foi adicionado em todas as amostras homogeneizadas 200 µl de clorifórmio para biomol, e então, 30 segundos no vortex. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12 g por 15 minutos à 4 graus Celcius, e então, retirado cerca de 400 – 500 µl de RNA e adicionado 500 ul de alcool 2-propanol para biomol. Após isso, centrifugou mais uma vez a 12.000 rpm por 10 minutos à 4 graus Celcius. Ao término da centrifugação, o resultado foi um pellet branco ao fundo do eppendorf. Por inversão, desprezou o sobrenadante que estava dentro do eppendorf. Foi adicionado 1 ml de etanol 75% e soltado o pellet com ciclos de aspiração e expiração utilizando a pipeta. Novamente, centrifugou a 8000 g por 5 minutos à 4 graus Celcius. O líquido dentro do eppendorf foi retirado por inversão e deixado o tubo secando sob folhas de papel toalhama (no máximo 20 minutos). Foi adicionado 20-25 µl de água DEPC ao pellet. Após isso, as amostras foram levadas ao thermomixer à 65 graus Celcius por 10 minutos com agitação de 750 RPM. Ao fim, foram quantificadas no NANODROP 2000, e então, armazenadas no -80 graus.

A análise de PCR em tempo real foi utilizada para determinar a expressão de genes selecionados relacionados ao transporte de íons hidrogênio (MCT1, MCT4, NHE) nas biópsias musculares. O gene de referência utilizado foi o GAPDH. A síntese do primer foi terceirizada (IDT, Coralville, IA). O músculo liofilizado foi homogeneizado e o RNA total isolado usando reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após esse processo, o material foi diluído em água e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher®). Após este processo, amostras de cDNA foram obtidas a partir do material de RNA quantificado. Esse processo foi realizado com um kit de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, EUA), e seguiu os padrões propostos pelo fabricante. A partir daí, o cDNA foi utilizado como modelo para a análise de qPCR em que os ensaios TaqMan® inventariados para os genes de interesse e foram usados para determinar a

expressão gênica usando o equipamento 7500 Fast – Applied Biosystems®. O cálculo dos resultados fornecidos por esta última etapa foi realizado pelo método 2-ddCT (Livak e Schmittgen, 2001) utilizando GAPDH como controle. As principais comparações na expressão gênica foram: mudança de expressão de Pré-suplementação para Pós-suplementação (90 min) em PL e SB; mudança de expressão de Pré-suplementação para Pós-exercício em PL e SB; mudança de expressão entre PL e SB idênticos em momentos idênticos (Pré-suplementação; Pós-suplementação; Pós-exercício).

5.10 Análises musculares de pH

O tecido muscular foi imediatamente congelado em líquido N2 e armazenado em 80-C. A amostra congelada foi pesada antes e depois da liofilização para avaliação do teor de água. Após a liofilização, a amostra muscular foi dissecada sem sangue, gorduras e tecido conjuntivo, e cerca de 1 mg de tecido seco foi extraído em uma solução de ácido perclórico 0,6 M (PCA) e EDTA 1 m.M. neutralizado a pH 7,0 com KHCO₃ 2,2 M e armazenado em 80-C até analisar o lactato por um ensaio fluorométrico. O pH muscular foi medido por um copo pequeno de eletrodo (Radiometer GK2801, Copenhagen, Denmark) após homogeneizar uma amostra muscular liofilizada de cerca de 2 mg d.w. em uma solução não absorvente contendo 145 mM KCl, NaCl 10 mM e ácido iodoacético 5 mM.

5.11 Avaliação da ingestão dietética

A avaliação da ingestão dietética foi baseada recordatório de 24 horas obtidos nos dias que antecedem as sessões principais do estudo. O questionário se baseou na listagem de comidas e bebidas consumidas durante 24 horas. Suplementos alimentares também

foram registrados. Valor energético e teor de macronutrientes serão analisados pelo software Avanutri online (Avanutri, Rio de Janeiro, Brazil).

5.12 Análise estatística

Foi utilizado o teste-t de amostras emparelhadas para determinar o efeito da sessão (dois níveis: bicarbonato de sódio e placebo) nas variáveis de exercício (tempo para completar e frequência cardíaca) e ingestão dietética. Foi utilizado o modelo misto para determinar o efeito da sessão (dois níveis: bicarbonato de sódio e placebo) e tempo (4 níveis: repouso, pré exercício, pós aquecimento e pós exercício) nas variáveis sanguíneas (pH, bicarbonato e lactato). Foi utilizado o modelo misto para determinar o efeito da sessão (dois níveis: bicarbonato de sódio e placebo) e tempo (níveis: repouso, pré exercício e pós exercício) para a expressão gênica do MCT1 e MCT4. Foi realizado um teste t para avaliar a frequência cardíaca, percepção subjetiva de esforço, ingestão energética e capacidade tamponante muscular para determinar o efeito da sessão (dois níveis: placebo e bicarbonato de sódio). Todas as análises foram feitas usando o software SAS® Studio online. Os dados foram apresentados com média e ± 1 desvio padrão e o nível de significância foi de $P \leq 0.05$. As respostas individuais relacionadas ao tempo para completar 1-km contrarrelógio foi baseada na tabela de Swinton et al. (2018) utilizando o intervalo de confiança de 90%, um erro típico (0.4202 s) calculado da reprodutibilidade do 1-km contrarrelógio baseado em Bellinger and Minahan (2014) e uma menor mudança vantajosa de 0,2 x o desvio padrão da sessão de controle (Paton e Hopkins, 2006).

6 RESULTADOS

6.1 Características dos participantes

Doze voluntários estão com suas características representadas na tabela abaixo (tabela 1).

Tabela 1 - Características dos participantes (N = 12)

Idade (a)	24 ± 2
Altura (m)	1,78 ± 0,05
Peso Corporal (kg)	84,9 ± 13,5
Índice de Massa Coporal (kg/m ²)	26,8 ± 4,2
VO _{2max} (mL/min/kg)	47,9 ± 9,6
Pico de Potência (W)	210,0 ± 24,2

6.2 Tempo para completar 1-km contrarrelógio

Não houve um efeito da ordem da sessão no tempo para completar 1-km contrarrelógio (P = 0.90). Houve um efeito da sessão no tempo para completar 1-km contrarrelógio, sendo maior tempo nas sessões com suplementação de bicarbonato de sódio comparado as sessões placebo (P = 0.02). As análises individuais mostraram apenas um voluntário que melhorou a performance, seis que não tiveram mudanças, enquanto cinco voluntários pioraram a performance esportiva com a utilização de bicarbonato de sódio.

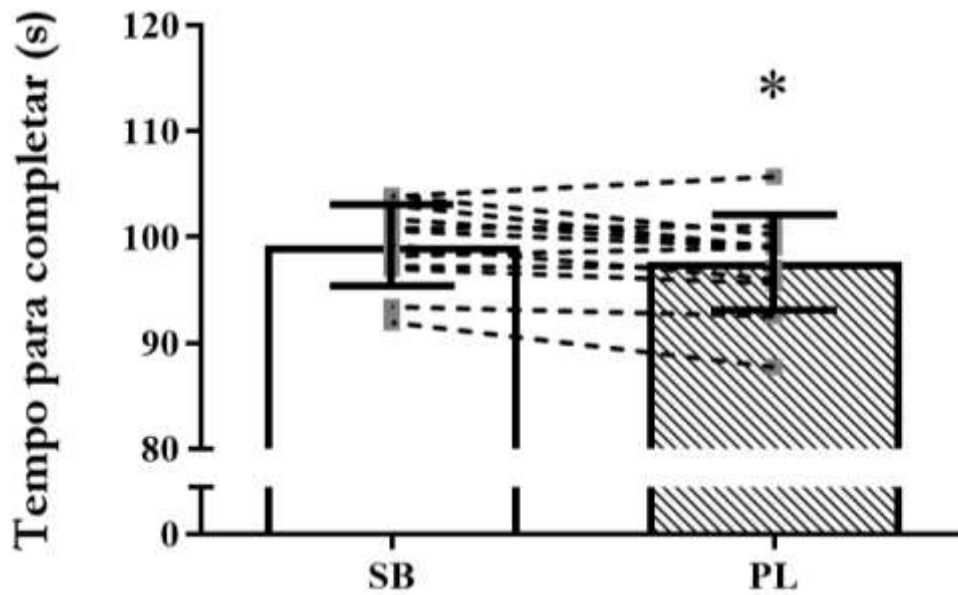


Figura 2 - Tempo para completar 1 km contra-relógio na sessão bicarbonato de sódio (SB) e sessão placebo (PL).

*Significativamente diferente de bicarbonato de sódio.

6.3 Percepção subjetiva de esforço

Após a realização de um test t, não houve nenhuma diferença na percepção subjetiva de esforço ($P=0.133$) entre os grupos placebo e bicarbonato de sódio (tabela 2).

Tabela 2 - Percepção subjetiva de esforço (PSE) imediatamente após o 1-km contrarrelógio (N=12).

Grupo	PSE
Placebo	18 ± 1
Bicarbonato de Sódio	17 ± 2

6.4 Frequência cardíaca

Não teve nenhuma diferença em frequência cardíaca média ($p=0.44$) e frequência cardíaca máxima ($p=0.11$) entre os grupos placebo e bicarbonato de sódio (tabela 3).

Tabela 3 - Frequência cardíaca (FC) durante 1-km contrarrelógio (N=12).

Grupo	FC Média (batimentos/min)	FC Máxima (batimentos/min)
Placebo	155 ± 19	177 ± 11
Bicarbonato de Sódio	157 ± 21	169 ± 23

6.5 pH, lactato e bicarbonato sanguíneo

Houve um efeito de sessão ($P < 0.0001$), tempo ($P < 0.0001$) e interação de sessão x tempo ($P < 0.0001$) para pH sanguíneo (tabela 4). Não houve diferença no pH em repouso entre as sessões ($P = 0.99$). O pH sanguíneo aumentou do repouso para o pré-aquecimento na sessão bicarbonato de sódio ($P = 0.0002$), mas não na sessão placebo ($P = 0.61$). O pH sanguíneo não mudou do pré-aquecimento para o pós aquecimento tanto na sessão bicarbonato de sódio quanto na sessão placebo (ambos $P > 0.99$), mas manteve mais elevado no pós aquecimento do que no repouso na sessão bicarbonato de sódio ($P = 0.0008$). O pH sanguíneo reduziu do pós aquecimento para o pós exercício nas sessões bicarbonato de sódio e placebo (ambos $P < 0.0001$), porém, se manteve mais elevado na sessão bicarbonato de sódio em comparação ao placebo após o exercício físico ($P < 0.0001$).

Houve um efeito de sessão ($P < 0.0004$), tempo ($P < 0.0001$) e interação de sessão x tempo ($P < 0.0001$) para o bicarbonato sanguíneo (tabela 4). Não houve diferença no bicarbonato sanguíneo entre as sessões ($P = 0.99$). O bicarbonato sanguíneo aumentou do repouso para o pré aquecimento na sessão bicarbonato de sódio ($P = 0.0001$), mas não no placebo ($P = 0.95$). O bicarbonato sanguíneo não mudou da pré aquecimento para o pós aquecimento tanto na sessão bicarbonato de sódio quanto na sessão placebo (ambos $P > 0.57$), mas manteve mais elevado no pós aquecimento do que em repouso na sessão

bicarbonato de sódio ($P < 0.0001$). O bicarbonato sanguíneo reduziu do pós aquecimento para o pós exercício tanto na sessão bicarbonato de sódio quanto no placebo (ambos $P < 0.0001$), porém, se manteve mais elevado na sessão bicarbonato de sódio em comparação ao placebo após o exercício físico ($P = 0.02$).

Houve um efeito da sessão ($P = 0.02$) e tempo nas concentrações sanguínea de lactato ($P < 0.0001$), mas nenhuma interação de sessão x tempo ($P = 0.64$) (tabela 4). O lactato sanguíneo não mudou do repouso até nenhum outro tempo, exceto após o exercício físico em ambas as sessões ($P < 0.0001$).

Tabela 4 - Análises sanguíneas durante 1-km contra relógio nas sessões principais (N=12)

Placebo				
	Repouso	90 min após	Pós aquecimento	Imediatamente pós exercício
pH	7.436 ± 0.018	7.415 ± 0.035	7.408 ± 0.031	7.220 ± 0.045 [^]
Lactato (mmol/L)	0.9 ± 0.5	1.2 ± 1.0	1.5 ± 0.3	12.3 ± 3.5 [^]
Bicarbonato (mmol/L)	23.6 ± 2.4	24.7 ± 4.1	23.1 ± 3.2	12.9 ± 2.3 [^]
Bicarbonato de Sódio				
	Repouso	90 min após	Pós aquecimento	Imediatamente pós exercício
pH	7.442 ± 0.026	7.498 ± 0.027* [^]	7.494 ± 0.029* [^]	7.323 ± 0.04* [^]
Lactato (mmol/L)	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.5	3.1 ± 2.3	12.9 ± 2.3 [^]
Bicarbonato (mmol/L)	25.2 ± 2.6	31.9 ± 5.0* [^]	31.1 ± 4.9* [^]	18.2 ± 3.4* [^]

*Significativamente diferente de PL. [^] Significativamente diferente de Repouso.

6.6 Efeitos colaterais da suplementação

Os efeitos colaterais nas duas sessões foram pouco prevalentes (tabela 5). Houve um efeito de tempo para a soma das pontuações para efeitos colaterais ($P = 0.01$), mas

nenhum efeito da sessão ($P = 0.49$) ou interação de sessão x time ($P = 0.06$). Não houve correlação entre a soma das pontuações para efeitos colaterais pré exercício físico e performance esportiva ($r^2 = 0.03$, $P = 0.18$).

Tabela 5 - Efeitos colaterais relatados após a suplementação de placebo ou bicarbonato de sódio na escala de 0 - 10 (N=12)

Efeitos Colaterais										
	Dor de cabeça	Estufamento	Arroto	Dor de estômago	Náusea e enjoo	Vômito	Flatulência	Dor intestinal	Inchaço	Diarreia
PL REP	1 ± 2	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PL 90	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	1 ± 2	0 ± 1	1 ± 2	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 0
SB REP	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
SB 90	0 ± 1	0 ± 1	2 ± 3	1 ± 2	2 ± 2	0 ± 0	1 ± 2	1 ± 2	1 ± 2	1 ± 3

Placebo repouso (PLREP); Placebo 90 minutos após a suplementação (PL90); Bicarbonato de sódio repouso (SBREP); Bicarbonato de sódio 90 minutos após a suplementação (SB90).

6.7 Expressão proteica de MCT1 e MCT4

Os dados preliminares da expressão proteica do MCT1 e MCT4 estão apresentados nas imagens em anexo neste documento. O processo de Western Blotting precisará ser refinado para melhor resolução e qualidade nos resultados de fotorevelação na qual serão posteriormente analisadas novamente para melhor apresentação no artigo científico a ser publicado subsequentemente. Por ainda estar em fase de refinamento, ainda não é possível obter resultados estatísticos em relação a expressão do MCT1 e MCT4 em resposta a suplementação de bicarbonato de sódio.

6.8 Expressão gênica do MCT1 e MCT4

MCT 1

Não houve diferença na expressão do gene delta de pré-suplementação para pós-

suplementação entre as sessões ($P = 0,36$); e a expressão não excedeu 1,7 para qualquer visita ($PL = 1,33 \pm 1,86$; $SB = 1,68 \pm 1,21$). Não houve diferença na expressão do gene delta desde a pré-suplementação até o pós-exercício entre as sessões ($P = 0,28$); expressão exceder o limiar de 1,7 em SB, mas não em PL ($PL = 0,91 \pm 0,70$; $SB = 1,95 \pm 2,05$). A expressão de MCT1 foi regulada positivamente ($\geq 1,7$) entre SB e PL na pós-suplementação ($2,74 \pm 2,83$), mas não na pré-suplementação ($1,58 \pm 1,48$) ou pós-exercício ($0,60 \pm 0,60$).

MCT 4

Não houve diferença na expressão do gene delta desde a pré-suplementação até a pós-suplementação entre as sessões ($P = 0,15$); e a expressão não foi regulada positivamente para nenhuma das visitas ($PL = 0,39 \pm 0,55$; $SB = 1,31 \pm 1,27$). Não houve diferença na expressão do gene delta desde a pré-suplementação até o pós-exercício entre as sessões ($P = 0,26$); expressão excede o limiar de 1,7 em PL ($2,04 \pm 1,76$), mas não em SB ($1,25 \pm 1,26$). A expressão de MCT4 foi regulada positivamente ($\geq 1,7$) entre SB e PL na pré-suplementação ($1,79 \pm 2,96$), mas não pós-suplementação ($1,49 \pm 1,67$) ou pós-exercício ($1,50 \pm 2,11$).

NHE

Não houve diferença na expressão do gene delta de pré-suplementação para pós-suplementação entre as sessões ($P = 0,19$; Figura 3, Painel C), embora a expressão tenha sido regulada positivamente em SB, mas não em PL ($PL = 1,05 \pm 0,81$; $SB = 3,85 \pm 4,17$). Da mesma forma, não houve diferença na expressão do gene delta desde a pré-suplementação até o pós-exercício entre as sessões ($P = 0,63$), embora a expressão tenha sido regulada positivamente no SB, mas não no PL ($PL = 0,98 \pm 1,04$; $SB = 2,78 \pm 2,61$). A expressão de MCT1 foi regulada positivamente ($\geq 1,7$) entre SB e PL na pós-

suplementação ($4,64 \pm 6,90$), mas não na pré-suplementação ($0,91 \pm 0,77$) ou pós-exercício ($0,42 \pm 0,39$) (Figura 3, Painel C).

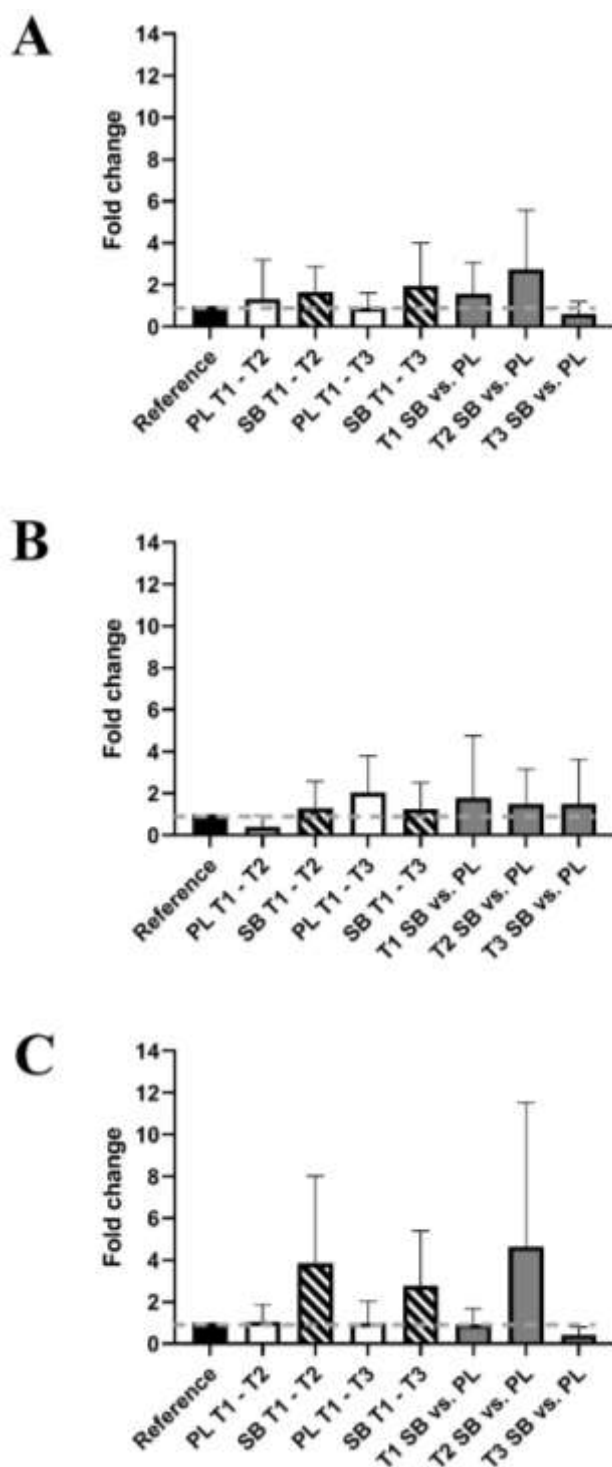


Figura 3 - Expressão gênica para MCT1 (Painel A), MCT4 (Painel B) e NHE (Painel C). PL = sessão de placebo, SB = sessão de bicarbonato de sódio. T1 – T2 = mudança delta de Pré-suplementação para Pós-suplementação. T1 – T3 = mudança delta de Pré-suplementação para Pós-exercício.

6.9 Capacidade tamponante muscular e pH muscular

Em relação a capacidade de tamponamento do músculo esquelético, não houve diferença entre as sessões placebo e bicarbonato de sódio ($P=0.9943$). Não houve diferença entre os tempos repouso, 90 minutos após a suplementação e pós exercício ($P=0.9365$). Não foi observado nenhuma interação entre sessão x tempo ($P=0.5342$).

Agora, em relação ao pH muscular, também não houve diferença entre as sessões placebo e bicarbonato de sódio ($P=0.5887$). Não houve diferença entre os tempos repouso, 90 minutos após a suplementação e pós exercício ($P=0.0738$). Não foi observado nenhuma interação entre sessão x tempo ($P=0.1067$).

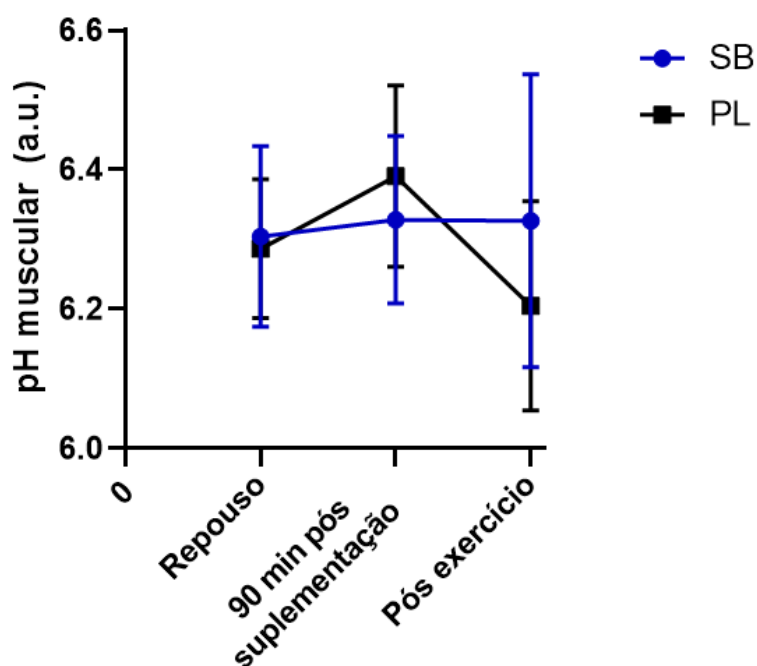


Figura 4 – pH muscular no repouso, 90 minutos após a suplementação e imediatamente pós exercício nas sessões bicarbonato de sódio (SB) e sessão placebo (PL).

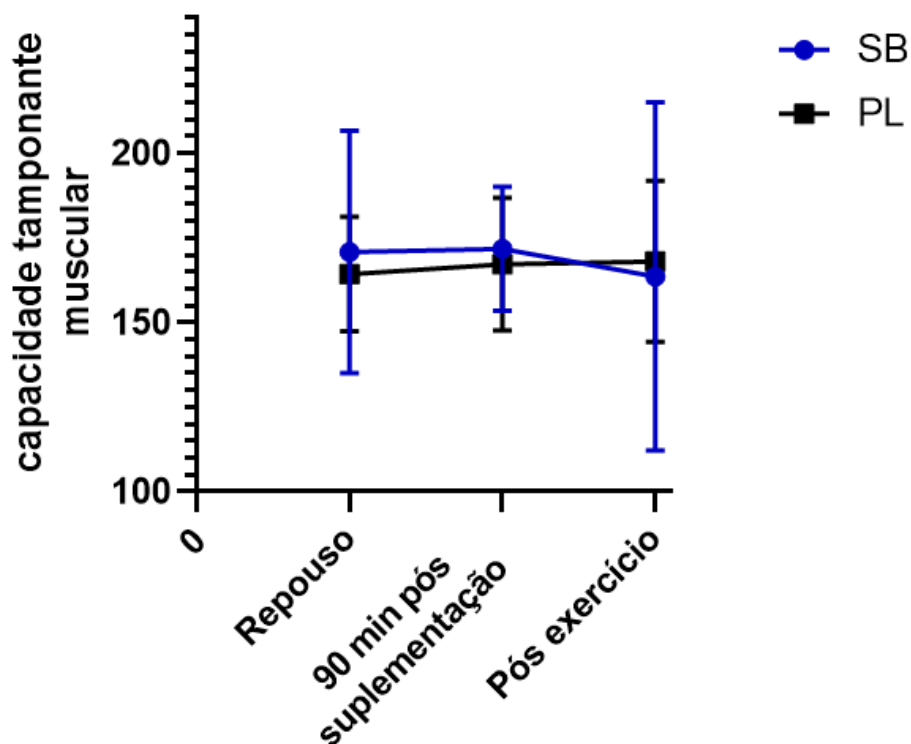


Figura 5 – Capacidade tamponante muscular no repouso, 90 minutos após a suplementação e imediatamente pós exercício nas sessões bicarbonato de sódio (SB) e sessão placebo (PL).

6.10 Recordatório alimentar

A ingestão energética total ($P = 0.18$), ingestão de carboidratos relativa ($P = 0.58$) e absoluta ($P = 0.30$) e ingestão de lipídeos relativa ($P = 0.42$) e absoluta ($P = 0.66$) não teve diferença significativa entre cada sessão. Porém, a ingestão de proteínas relativa ($P = 0.03$) e absoluta ($P = 0.03$) teve diferença entre as visitas (tabela 6).

Tabela 6 - Recordatório alimentar dos participantes 24h antes das sessões principais (N=12)

Recordatório Alimentar			
	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos
	(g/kg/dia)	(g/kg/dia)	(g/kg/dia)
Placebo	1,8 ± 0,6	4,4 ± 1,6	1,0 ± 0,3
Bicarbonato de Sódio	1,6* ± 0,4	4,3 ± 1,3	1,1 ± 0,3

*Significativamente diferente de Placebo.

7 DISCUSSÃO

Os resultados obtivos até o momento mostram que a suplementação de 0,3 g/kg de bicarbonato de sódio não melhorou o desempenho esportivo no teste de 1-km contrarrelógio, inclusive teve um tempo pior para completar o teste comparado ao grupo placebo. Em contraste a isso, a suplementação de bicarbonato de sódio, promoveu uma alcalose pré exercício físico, o que em alguns estudos prévios demonstra ser um fator chave para a melhora do rendimento esportivo, mas isso não foi observado em nossos resultados. Outros resultados mostram nenhuma diferença na frequência cardíaca, percepção subjetiva de esforço, expressão gênica do MCT1 e MCT4, pH muscular e capacidade de tamponamento muscular entre as sessões placebo e bicarbonato de sódio.

Esse resultado de piora no desempenho esportivo é um pouco curioso, desde que um estudo conduzido por Bellinger (2016), investigou a suplementação de outro suplemento tamponante (beta-alanina) na performance de 1-km contrarrelógio e observou nenhuma diferença entre o grupo suplementado com beta-alanina em comparação ao grupo placebo. Uma das explicações discutidas pelos autores do estudo é que o teste de 1-km contrarrelógio não teria uma alta capacidade de induzir a acidose muscular, e assim, teria pouca influência de um suplemento tamponante, como o bicarbonato de sódio. No entanto, o tempo para completar 1-km contrarrelógio levou cerca de 98 s para ser concluído pelos nossos participantes, o que está dentro da faixa esperada de duração do exercício a ser melhorada positivamente por suplementos tamponantes (Saunders et al., 2017; Heibel et al., 2018), além disso, os dados sanguíneos de pH pós exercício físico mostram uma queda, caracterizando um quadro de acidose. Outro estudo conduzido por McNaughton e colaboradores (1992), demonstrou que a suplementação de bicarbonato de sódio, e conseqüentemente, a alcalose pré exercício induzida pelo suplemento,

melhorou o rendimento esportivo e sprints de ciclismo de aproximadamente 60 segundos. Mas, algumas diferenças são observadas comparado esses dados com o do presente estudo, com destaque para a diferença da população estudada, enquanto nossos voluntários eram fisicamente ativos, a amostra estudada por McNaughton eram homens sedentários. Atualmente, não está claro por que o SB não melhorou o desempenho do exercício aqui e é ainda menos óbvio porque realmente piorou o desempenho, porém, o fato da população estudada não ser atletas de alto rendimento e ter uma grande variabilidade no nível de treinamento, pode ter limitado os resultados.

Um dos pontos mais discutidos nos últimos anos em relação a suplementação de bicarbonato de sódio e desempenho esportivo está em torno quantidade necessária de aumento na concentração sanguínea para promover um efeito ergogênico. Esse valor ainda é um pouco desconhecido, porém, alguns estudos, sugerem que um aumento de + 5 mmol/L é o mínimo necessário para ter um efeito ergogênico, e que o aumento de + 6 mmol/L é um valor de quase certeza de efeito ergogênico (Carr et al., 2011). Recentemente, foi publicado uma meta-análise que destaca o papel do bicarbonato de sódio como suplemento tamponante extracelular de destaque para a melhora do rendimento esportivo, e os autores, destacam que aumentos a parte de 4 mmol/L na concentração sanguínea de bicarbonato é o suficiente para promover um efeito ergogênico (De Oliveira et al., 2021). Os dados do presente estudo mostra um aumento de + 5.7 mmol/L do repouso para o pré-exercício, porém, isso não foi correlacionado com a melhora da performance esportiva. Esses resultados também foram observados por Saunders et al., (2018) que não observaram uma correlação de um aumento similar ao do presente estudo, de + 5.7 mmol/L com a melhora da performance esportiva em um teste CCT_{110%}. Estudos prévios sugerem que os efeitos colaterais podem atenuar os efeitos

ergogênicos da suplementação de bicarbonato de sódio, e podem inclusive, piorar a performance esportiva (Saunders et al., 2014). Porém, a prevalência de efeitos colaterais no presente estudo foi extremamente baixa e não teve diferença entre as sessões placebo e bicarbonato de sódio. Além disso, a prevalência de efeitos colaterais pré exercício físico não foi correlacionada com o tempo para completar 1-km contrarrelógio. Com isso, os efeitos colaterais parecem não ter influenciado nos resultados e não pode ser uma explicação para a redução da performance esportiva.

Outra grande discussão da ciência que envolve a suplementação de bicarbonato de sódio é a grande variabilidade nos estudos. Respostas individuais são vistas, inclusive em diferentes sessões empregadas com a mesma dose de bicarbonato de sódio, porém, resultando em diferentes respostas (inclusive em não mudanças no desempenho), como mostrado por Frio de Araújo et al. (2015). A ação do bicarbonato de sódio pode estar relacionada a atividade dos transportadores de íons de hidrogênio (MCT1, MCT4 e NHE). Embora esse seja o principal mecanismo de ação discutido pelos estudos da área, nenhum estudo até o momento investigou se existe uma direta relação entre o aumento das concentrações sanguínea de bicarbonato com o comportamento desses transportadores. Esse será o primeiro estudo a investigar essa relação. Os resultados à respeito da expressão gênica, não mostraram nenhuma diferença entre as sessões de bicarbonato de sódio e placebo em relação a expressão do MCT1 e MCT4. Estudos prévios, empregaram apenas protocolos de exercício físico para investigar o efeito sobre o comportamento desses transportadores, no qual, a maioria dos estudos observam um aumento da expressão em protocolos de treinamento com no mínimo 4 semanas (Fransson et al., 2017), enquanto nenhuma mudança foi vista em exercícios agudos (Green et al., 2011).

A expressão dos genes relacionados ao transporte de H⁺ foi analisada, com a mudança delta de pré para pós-suplementação não mostrando diferenças estatísticas entre as visitas. Embora houvesse alguma sugestão de que o MCT4 foi regulado positivamente após o exercício, isso apenas ultrapassou o limite (2,04 vs. 2,0). Parece haver regulação positiva do NHE com bicarbonato de sódio após a suplementação e pós-exercício, embora isso não tenha sido estatisticamente diferente do placebo. Assim, ainda não está claro se este foi um efeito devido à suplementação de bicarbonato de sódio. Geralmente considera-se que o bicarbonato de sódio aumenta a atividade dos MCTs, mas não o NHE (Juel, 1997, Mainwood e Worsley-Brown, 1975), embora a atividade do transportador não tenha sido medida aqui. Este estudo teve como objetivo determinar se a quantidade de transportadores, medida por Western Blot, foi aumentada após a suplementação de bicarbonato de sódio. A expressão gênica é considerada o primeiro passo nas mudanças fisiológicas, e os eventos pós-transcricionais resultam em mudanças cinéticas entre a expressão gênica e proteica (McGinley e Bishop, 2016). Uma vez que a suplementação de bicarbonato de sódio não parece influenciar a expressão gênica aqui, parece improvável que quaisquer mudanças no conteúdo de proteína sejam mostradas. No entanto, isso só pode ser confirmado quando a análise do teor de proteína estiver concluída. A suplementação de bicarbonato de sódio não levou a nenhuma alteração aguda na expressão gênica de transportadores relacionados ao efluxo de H⁺.

Nosso estudo possui algumas limitações, como por exemplo, o nível de treinamento físico dos participantes, que são considerados recreacionalmente treinados, e isso pode levar a uma maior variabilidade no desempenho do que em atletas treinados. Porém, devido a quantidade de biópsia e complexidade do protocolo, seria inviável realizar em atletas de elite. Além disso, a percepção de incômodo devido a biópsia pré-exercício pode

influenciar na capacidade de realizar o teste.

Embora a maioria dos estudos e posicionamentos internacionais preconizem que o pico de bicarbonato na corrente sanguínea aconteceria após 90 minutos da sua ingestão, um recente estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou que essa concentração de bicarbonato na corrente sanguínea se mantém elevado e sem grandes alterações por até 240 minutos após a ingestão (De Oliveira et al., 2020). Esse é um resultado muito importante para os próximos estudos que investigam a suplementação de bicarbonato de sódio, podendo permitir um maior intervalo entre a biópsia muscular e o início do teste físico.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação de 0,3 g/kg de bicarbonato de sódio foi capaz de promover um aumento de 5.7 mmol/L de bicarbonato na concentração sanguínea, e assim, promover uma alcalose pré exercício, mas isso não foi associado a melhora do desempenho esportivo no teste de 1-km contrarrelógio em homens recreacionalmente treinados, além de não promover nenhuma mudança fisiológica e molecular em fatores que estão associados a hipótese do seu mecanismo de ação na melhora do rendimento esportivo. Futuros estudos direcionados a investigar os efeitos do bicarbonato de sódio no exercício e comportamento do transportadores monocarboxilato devem ser realizados para eluciar sua maior aplicabilidade em outros cenários esportivos.

9 PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

9.1 Descrição de atividades até o momento e cronograma de execução

O estudo foi realizado dentro do período de mestrado programado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM – USP) que requer o prazo de 3 anos para execução do estudo. Durante o período de vigência da programa de mestrado, o laboratório ficou fechado por quase 12 meses (vide anexo), o que atrapalhou os planos iniciais e o cronograma de execução. Mas, mesmo com essa paralização, as coletas foram retomadas no final de 2020 e em abril de 2021 foi concluída com sucesso. Nesse momento, todas as coletas de dados foram analisadas por completo ou parcialmente. Dentre todas as análises previstas do estudo, as análises sanguíneas, testes físico, capacidade tamponante e expressão gênica por PCR-Real Time foram totalmente concluídas. As análises de expressão proteica através de Western Blotting estão concluídas parcialmente. Já é possível obter resultados parciais em relação a expressão proteica de MCT1 e MCT4, porém, esses resultados ainda não estão com a qualidade padrão que estudos do nosso laboratório usualmente apresentam, portanto, essa análise será refinada para apresentação de dados mais robustos e posterior publicação internacional. A previsão é que essa análise seja finalizada nos próximos dois meses e então, escrever e submeter o artigo científico no início do ano de 2022.

O programa de mestrado da Faculdade de Medicina (FM – USP) exige 16 créditos provenientes de disciplinas, todos esses créditos foram concluídos com êxito e o relatório das disciplinas será apresentado em anexo.

9.2 Disseminação dos resultados

Espera-se que os resultados desta investigação sejam disseminados em grande escala em importantes Conferências Internacionais, assim como o encontro anual do American College of Sports Medicine, o encontro anual do European College of Sports Science ou encontro anual da International Society for Sports Nutrition. É, também, esperado, que este trabalho produza manuscritos originais para publicação em jornais de grande importância na área específica como *Journal of Physiology*, *Journal of Applied Physiology* ou *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Em adição à disseminação dos dados através de fontes científicas, estes dados também terão grande importância prática para atletas e treinadores, portanto, disseminação para estes indivíduos através de meios apropriados deverá ser considerada.

10 ATIVIDADES ACADÊMICAS

10.1 Artigos publicados

1. **PERIM, P.** ; HEIBEL, A. ; ARTIOLI, G. ; GUALANO, B. ; SAUNDERS, B. . Low efficiency of b-alanine supplementation to increase muscle carnosine: a retrospective analysis from a 4-week trial. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*, 2021.

2. **PERIM, P.**, GOBBI, N., DUARTE, B., OLIVEIRA, L.F., COSTA, L.A.R., SALE, C., GUALANO, B., DOLAN, E., SAUNDERS, B., Beta-alanine did not improve high-intensity performance throughout simulated road cycling. *European Journal of Sport Science*, 2021.

3. BARRETO, G., OLIVEIRA, L.F., SAITO, T., KLOSTERHOFF, R., **PERIM, P.**, DOLAN, E., PEREIRA, R.M.R., CAMPOS-FERRAZ, P., LIMA, F.R. AND SAUNDERS, B. Reduced Endurance Capacity and Suboptimal Energy Availability in Top-Level Female Cyclists. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 2021.

4. MAZZOLANI, B., **PERIM, P.**, SMAIRA, F.I., REZENDE, N.S., BESTETTI, G.C., DUMAS, A., OLIVEIRA, L.F., SWINTON, P., DOLAN, E. AND SAUNDERS, B. Self-reported training variables are poor predictors of laboratory measures in cyclists. *The journal of sport and exercise science* [online], 2021.

5. RIBEIRO, R., LONGOBARDI, I., **PERIM, P.**, DUARTE, B., FERREIRA, P., GUALANO, B., ROSCHEL, H., SAUNDERS B., Timing of Creatine Supplementation around Exercise: A Real Concern? *Nutrients*, 2021.

6. **PERIM, PEDRO** ; MARTICORENA, FELIPE MIGUEL ; RIBEIRO, FELIPE ; BARRETO, GABRIEL ; GOBBI, NATHAN ; KERKSICK, CHAD ; DOLAN, EIMEAR ; SAUNDERS, BRYAN . Can the Skeletal Muscle Carnosine Response to Beta-Alanine Supplementation Be Optimized? *FRONTIERS IN NUTRITION*, v. 6, p. 1-10, 2019.

7. SAUNDERS, BRYAN ; SAITO, TIEMI ; KLOSTERHOFF, RAFAEL ; DE OLIVEIRA, LUANA FARIAS ; BARRETO, GABRIEL ; **PERIM, PEDRO** ; PINTO, ANA JÉSSICA ; LIMA, FERNANDA ; DE SÁ PINTO, ANA LUCIA ; GUALANO, BRUNO . -I put it in my head that the supplement would help me-: Open-placebo improves exercise performance in female cyclists. *PLoS One*, v. 14, p. e0222982, 2019.

8. HEIBEL, ANDRÉ B. ; **PERIM, PEDRO** ; OLIVEIRA, LUANA F. ; MCNAUGHTON, LARS R. ; SAUNDERS, BRYAN . Time to Optimize Supplementation: Modifying Factors Influencing the Individual Responses to Extracellular Buffering Agents. *FRONTIERS IN NUTRITION*, v. 5, p. Artigo 35, 2018.

10.2 Artigos aceitos para publicação

1. GUIZELLINI, G. M. ; **PERIM, PEDRO** ; BARRELLA, A. B. ; RODRIGUES, T. ; ROSSI, L. . Avaliação do estudo de hidratação de corredores amadores da cidade de São Paulo. *RBNE - Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, 2018.

10.3 Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. **PERIM, P.**, GOBBI, N., DUARTE, B., OLIVEIRA, L.F., COSTA, L.A.R., SALE, C., GUALANO, B., DOLAN, E., SAUNDERS, B., Beta-alanine did not improve high-intensity performance throughout simulated road cycling. Annual Meeting American College of Sports Medicina, 2021.

2. FERRAZ, P. C. ; BARRETO, G. ; OLIVEIRA, L. F. ; SAITO, T. ; KLOSTERHOFF, R. ; **PERIM, PEDRO.** ; DOLAN, E. ; LIMA, F. ; SAUNDERS, B. . A year in the life of a Brazilian professional female road cycling team? Part II: Nutritional and clinical outcomes. In: Science and Cycling, 2019, Bruxelas. Science and Cycling, 2019. (Journal of Science and Cycling, 48: 51-54).

3. **PERIM, PEDRO.**; MAZZOLANI, B. ; OLIVEIRA, L. F. ; SYMON, K. ; DOLAN, E. ; SAUNDERS, B. . Sport supplement use in Brazilian cyclists: Where is the information coming from?. In: Science and Cycling, 2019, Bruxelas. Science and Cycling, 2019. (Journal of Science and Cycling, 48: 66-68).

4. SAUNDERS, B. ; BARRETO, G. ; OLIVEIRA, L. F. ; SAITO, T. ; KLOSTERHOFF, R. ; **PERIM, PEDRO** ; DOLAN, E. ; FERRAZ, P. C. ; LIMA, F. . A year in the life of a Brazilian professional female road cycling team? Part I: Performance measures. In: Science and Cycling, 2019, Bruxelas. Science and Cycling, 2019. (Journal of Science and Cycling, 48: 45-47).

5. **PERIM, PEDRO.**, Heibel, A.B., Gualano, B. and Saunders, B. (2016). Low efficiency of beta-alanine supplementation for muscle carnosine accumulation in humans. 2nd International

Society of Sport Nutrition Brasil Meeting, Brasilia, Brazil. [Awarded 2nd place for Best Poster]. (Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2017, 14(Suppl 1): 8)

6. Heibel, A.B., **PERIM, PEDRO.** and Saunders, B. (2016). An update on extracellular buffering agents to improve exercise capacity and performance. 2nd International Society of Sport Nutrition Brasil Meeting, Brasilia, Brazil. (Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2017, 14(Suppl 1): 8)

10.4 Resumos publicados em anais de de congressos

1. SAUNDERS, BRYAN ; SAITO, T. ; KLOSTERHOFF, R. ; OLIVEIRA, L. F. ; BARRETO, G. ; **PERIM, PEDRO** ; PINTO, A. J. ; LIMA, F. ; PINTO, A. L. S. ; GUALANO, B. . Open-placebo improves 1-km time-trial performance in female cyclists. In: 2nd Official SIPS Conference on Placebo Studies, 2019, Leiden. 2nd Official SIPS Conference on Placebo Studies, 2019.

2. RIBEIRO, F. ; MARTICORENA, F. M. ; **PERIM, PEDRO.** ; SILVERIO, R. ; DAVID-SILVA, A. ; SAUNDERS, BRYAN . A importância da creatina no tratamento das comorbidades associadas à doença renal crônica no paciente em tratamento hemodialítico. In: Mega Evento de Nutrição Esportiva, 2019, São Paulo. Mega Evento de Nutrição Esportiva, 2019.

3. RIBEIRO, F. ; MARTICORENA, F. M. ; **PERIM, PEDRO.** ; SILVERIO, R. ; SAUNDERS, BRYAN ; DAVID-SILVA, A. . A síndrome do leaky gut pode contribuir para a patogênese da doença celíaca. In: Mega Evento de Nutrição Esportiva, 2019, São Paulo. Mega Evento de Nutrição Esportiva, 2019.

4. MARTICORENA, F. M. ; RIBEIRO, F. ; MOTTA, G. A. ; **PERIM, PEDRO.** ; SAUNDERS, BRYAN . Polimorfismo genético em transportadores de íons de hidrogênio (MCT1 e 4) e o possível impacto na performance de atletas. In: Mega Evento de Nutrição Esportiva, 2019, São Paulo. Mega Evento de Nutrição Esportiva, 2019.

5. **PERIM, PEDRO**; GOBBI, N. ; DUARTE, B. ; OLIVEIRA, L. F. ; SAUNDERS, BRYAN . Efeito da suplementação crônica de beta-alanina sobre a concentração de carnosina muscular e desempenho no ciclismo. In: Simpósio de Pesquisa da Escola de Educação Física e Esportes, 2018, São Paulo. Anais II Simpósio de Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte, 2018.

6. DUARTE, B. ; **PERIM, PEDRO** ; OLIVEIRA, L. F. ; SAUNDERS, BRYAN . Reprodutibilidade de um contrarrelógio de ciclismo de 1-km em indivíduos recreativamente ativos. In: II Simpósio de Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte, 2018, São Paulo. Anais II Simpósio de Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte, 2018.

7. GOBBI, N. ; **PERIM, PEDRO** ; DUARTE, B. ; OLIVEIRA, L. F. ; SAUNDERS, BRYAN . Suplementação de bicarbonato de sódio no desempenho de um contrarrelógio de ciclismo de 1-km. In: II Simpósio de Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte, 2018, São Paulo. Anais II Simpósio de Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte, 2018.

8. MARTICORENA, F. M. ; RIBEIRO, F. ; FERREIRA, P. ; **PERIM, PEDRO.** . Impactos do exercício físico no sistema imunológico. In: III Congresso Multiprofissional do Centro Universitário São Camilo, 2018, São Paulo. III Congresso Multiprofissional do Centro Universitário São Camilo, 2018.

9.FERREIRA, P. ; RIBEIRO, F. ; MARTICORENA, F. M. ; CURVO, L. ; **PERIM, PEDRO.**
. A influência do estresse no comportamento alimentar. In: III Congresso Multiprofissional do Centro Universitário São Camilo, 2018, São Paulo. III Congresso Multiprofissional do Centro Universitário São Camilo, 2018.

10.GOBBI, N. ; RIBEIRO, F. ; MARTICORENA, F. M. ; **PERIM, PEDRO.** . Otimizando a suplementação de Beta-alanina para aumento da carnosina muscular e desempenho físico. In: III Congresso Multiprofissional do Centro Universitário São Camilo, 2018, São Paulo. III Congresso Multiprofissional do Centro Universitário São Camilo, 2018.

10.5 Premiações

2021 Beta-alanine did not improve high-intensity performance throughout simulated road cycling, ACSM-GSSI Young Investigator Award.

2019 Polimorfismo genético em transportadores de íons de hidrogênio (MCT1 e 4) e o possível impacto na performance de atletas, Nutrição em Pauta.

2019 A importância da creatina no tratamento das comorbidades associadas à doença renal crônica no paciente em tratamento hemodialítico, Nutrição em Pauta.

2018 Fatores genéticos associados ao metabolismo da cafeína e impacto na performance de atletas, Nutrição em Pauta.

2018 Otimizando a suplementação de Beta-alanina para aumento da carnosina muscular e desempenho físico, Centro Universitário São Camilo.

2016 Trabalho premiado no congresso da Sociedade Internacional de Nutrição Esportiva, International Society of Sports Nutrition.

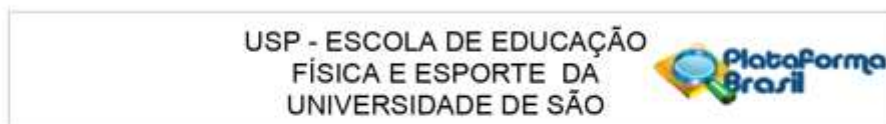
10.6 Participações em outros projetos

1. Perim, P.; Marticorena, F.; Ribeiro, F.; Saunders, B. Role of exercise in monocarboxylate transporter 1 and 4 expression. Fase de Escrita. Previsão de Publicação para 2021.

2. Duarte, B.; Perim, P.; Saunders, B.; Acute effects of β -alanine intake on the regulatory mechanisms of muscle carnosine content. Fase de Coleta de Dados. Previsão de Publicação para 2022.

11 ANEXOS

11.1 ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética para Estudos Científicos com Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Respostas sanguíneas e musculares à suplementação de bicarbonato de sódio e subsequente desempenho do exercício

Pesquisador: Bruno Gualano

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 80621317.5.0000.5391

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.370.777

Apresentação do Projeto:

O bicarbonato de sódio (BS) é um agente tampão que é considerado uma substância ergogênica auxiliar capaz de melhorar o desempenho do exercício devido ao seu efeito sobre a homeostase do pH muscular. A suplementação aguda aumenta os níveis circulantes de bicarbonato, aumentando posteriormente a taxa de efluxo de íons de hidrogênio (H⁺) fora do músculo, facilitada pelo co-transporte de H⁺ e lactato por transportadores de monocarboxilato (MCTs). A suplementação de BS pode levar a ganhos de exercício limitados pela acumulação de H⁺ (por exemplo, durante o exercício de alta intensidade). No entanto, nenhum estudo até o momento determinou se a magnitude na mudança no BS de sangue e no pH está relacionada à magnitude da mudança no desempenho do exercício. O estudo fornecerá informações sobre a relação entre os aumentos no bicarbonato com suplementação SB e seu impacto direto no desempenho subsequente do exercício. Para isso serão convidados 15 homens saudáveis (idade de 18 – 35 anos) para comparecer ao laboratório em três visitas distintas para um estudo duplo-cego, controlado por placebo, randomizado. Os participantes serão suplementados com dose aguda de 0,3g/kg de bicarbonato de sódio ou placebo (Farmácia Analítica, Brasil) em cápsulas gelatinosas opacas. Uma hora antes da suplementação serão coletadas amostras sanguíneas a cada 10 minutos e será realizada a primeira biópsia muscular. A segunda biópsia muscular será realizada imediatamente antes do aquecimento para o teste físico juntamente com novas coletas sanguíneas. Por fim, imediatamente após o teste será realizado a terceira biópsia muscular e novas

Endereço: Av. Prof Mello Moraes, 85
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-030
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3097 **Fax:** (11)3812-4141 **E-mail:** cep39@usp.br

USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.370.777

coletas sanguíneas. Em conjunto as três biópsias musculares e coletas sanguíneas, serão aplicadas um questionário para avaliação dos efeitos colaterais associados à suplementação de bicarbonato de sódio. As coletas musculares e sanguíneas serão avaliadas para pH e H⁺ musculares além da expressão dos transportadores de H⁺ (MCT1 e MCT4) do músculo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é avaliar as alterações da atividade de transportadores relacionados a esse efluxo de H⁺ (MCT1, MCT4, NHE) gerado pela suplementação aguda de bicarbonato de sódio e o subsequente efeito no rendimento esportivo. Além disso, as características genéticas do MCT1 e MCT4 podem afetar na atividade desses transportadores, e consequentemente, impactar na performance esportiva portanto, será acrescentado no estudo a determinação do genótipo dos voluntários, uma vez que isso pode influenciar nos resultados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto apresenta risco médio para os participantes, pois será feita coleta de sangue e biópsia muscular. Os testes físicos poderão levá-lo a um grande cansaço físico, já que serão de alta intensidade. No caso de alguma intercorrência grave, os

pesquisadores estão treinados a prestar primeiros socorros e os laboratórios estão equipados com os principais instrumentos em caso de emergência. O médico da unidade poderá atendê-lo toda vez que necessário. Havendo necessidade, você poderá ser encaminhado para o HU-USP (Hospital Universitário da USP) ou HC-FMUSP (Hospital das Clínicas). A punção do dedo pode trazer um desconforto moderado devido à picada da

agulha. A punção da veia pode trazer um desconforto no braço devido ao aperto pelo garrote e à picada da agulha. Além disso, em alguns casos poderá ocorrer um hematoma (mancha roxa) em seu braço. No entanto, apenas uma punção por sessão ocorrerá para inserir uma cânula na veia; posteriormente, todas as coletas de sangue serão retiradas desta cânula.

A biópsia muscular causará um pequeno desconforto de picada no momento da anestesia. Embora sua perna esteja anestesiada (portanto, você não deverá sentir dor), a introdução da agulha de biópsia pode causar incômodo. Esse incômodo é rápido e não deve durar mais do que 2 ou 3 segundos. A biópsia é feita de forma limpa e asséptica. Apesar da biópsia ser um procedimento invasivo, a equipe é bem experiente e treinada neste procedimento, e não existem relatos de problemas graves associados à biópsia no laboratório. Mesmo assim, havendo necessidade, os participantes poderão ser encaminhado para o HU-USP (Hospital Universitário da USP) ou HC-FMUSP (Hospital das Clínicas). As coletas sanguíneas e biópsias musculares serão realizadas apenas na últimas duas visita.

Endereço: Av. Profº Mello Moraes, 65
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-030
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3097 **Fax:** (11)3912-4141 **E-mail:** cep39@usp.br

**USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO**



Continuação do Parecer: 3.370.777

Como benefício os voluntários participantes da pesquisa terão acesso a avaliações padrão-ouro do seu estado de saúde e condicionamento físico. Além disso, terão direito a consultas nutricionais, onde receberão aconselhamento profissional sobre como pode melhorar seus hábitos alimentares. Ainda, poderão tirar todas as dúvidas que tiver sobre alimentação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será incluído no projeto uma nova coleta de sangue para a determinação da genotipagem dos transportadores de íons de hidrogênio (MCT1 e MCT4). Isso irá substancialmente contribuir com os resultados do estudo em questão, sem nenhum desconforto adicional para o voluntário.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado a nova coleta incluída no estudo

Recomendações:

Aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda ao Projeto para uma nova coleta de sangue para a determinação da genotipagem dos transportadores de íons de hidrogênio (MCT1 e MCT4).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1336658_E1.pdf	15/04/2019 11:36:11		Aceito
Outros	AmendmentLetterSB.docx	15/04/2019 11:34:24	Bryan Saunders	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoBicarbonato_PlataformaBrasil_Addendum.docx	15/04/2019 11:34:08	Bryan Saunders	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ProjetoBicarbonatodeSodio_Addendum.doc	15/04/2019 11:33:59	Bryan Saunders	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_SB_Assinado.pdf	28/11/2017 14:53:25	Bryan Saunders	Aceito
Outros	ProjetoSB_Assinado.pdf	28/11/2017	Bryan Saunders	Aceito

Endereço: Av. Prof Mello Moraes, 65

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3097

Fax: (11)3812-4141

E-mail: cep30@usp.br

USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.370.777

Outros	ProjetoSB_Assinado.pdf	14:52:24	Bryan Saunders	Aceito
--------	------------------------	----------	----------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Junho de 2019

Assinado por:
Edilamar Menezes de Oliveira
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Mello Moraes, 65
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-030
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3097 **Fax:** (11)3812-4141 **E-mail:** cep30@usp.br

11.2 ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do Estudo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE
Comitê de Ética em Pesquisa

Formulário E

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. DADOS DO INDIVÍDUO

Nome completo _____
 RG _____
 CPF: _____
 Data de nascimento _____
 Endereço completo _____
 CEP _____
 Fone _____
 E-mail _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do Projeto de Pesquisa
2. Pesquisador Responsável
3. Cargo/Função
4. Avaliação do risco da pesquisa:
 RISCO MÍNIMO RISCO BAIXO RISCO MÉDIO RISCO MAIOR
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
5. Duração da Pesquisa

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO INDIVÍDUO OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, DE FORMA CLARA E SIMPLES, CONSIGNANDO:

1. Esta pesquisa pretende investigar: 1) os efeitos da suplementação de bicarbonato de sódio e os efeitos do polimorfismo no gene dos transportadores de hidrogênio (MCT1 e MCT4) em respostas musculares e sanguíneas em marcadores relacionados a fadiga muscular durante o exercício (pH, lactato, íons de hidrogênio e transportadores de íons de hidrogênios) 2) além disso, o presente estudo pretende avaliar a relação entre o aumento individual das concentrações sanguíneas de bicarbonato de sódio e o respectivo efeito desse aumento no desempenho físico durante o teste contra relógio de 1 quilômetro (1-km).
2. Sua participação no estudo terá a duração de 4 semanas com 5 visitas ao laboratório (mínimo 48 h entre as sessões). Na primeira visita, você realizará coleta de sangue através de uma punção na veia antecubital para posterior determinação do seu genótipo; depois você realizará um teste

- incremental no cicloergômetro para determinarmos sua capacidade aeróbia um teste de ciclismo em que a carga (dificuldade) do teste será crescente, até que você não consiga mais manter o exercício. Na segunda e terceira visita você comparecerá ao laboratório para realizar a familiarização do teste físico, que é caracterizado por um teste contra relógio de 1-km.
3. Na quarta e quinta visita (7 dias mínima entre as sessões) serão realizadas os testes principais quem incluirão coletas sanguíneas da veia e do dedo, e três biópsias musculares feito por um profissional qualificado e experiente (Dr. Luiz Riani). A canulação será realizada por um indivíduo treinado em punção venosa e canulação (Dr Bryan Saunders). As amostras de sangue e músculo serão coletadas 60 minutos antes da suplementação de 0,3 g/kg de bicarbonato de sódio ou placebo; 50 minutos (10 minutos antes do exercício) após a suplementação; e imediatamente após o protocolo de teste físico (contra relógio de 1-km). Em conjunto as coletas sanguíneas e musculares, será aplicado um questionário para a avaliação dos possíveis efeitos colaterais em resposta a suplementação de bicarbonato de sódio. Antes e após o teste de desempenho, serão coletados pequenas amostras de sangue i) da ponta de seu dedo para medirmos lactato; e ii) da veia para outros dados que nos dizem como está seu metabolismo (gasometria sanguínea). Além disso, você preencherá diários alimentares para que possamos avaliar seu consumo alimentar.
 4. Todas as visitas terão lugar no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada e Nutrição na Escola de Educação Física e Esporte - USP. Todos os testes serão realizados sob a supervisão de um fisiologista treinado (Dr. Bryan Saunders), enquanto um médico (Dr. Luiz Riani) permanecerá de prontidão nas instalações da Unidade, em caso de alguma emergência médica.
 5. Os testes físicos poderão levá-lo a um grande cansaço físico, já que serão de alta intensidade. No caso de alguma intercorrência grave, os pesquisadores estão treinados a prestar primeiros socorros e os laboratórios estão equipados com os principais instrumentos em caso de emergência. O médico da unidade poderá atendê-lo toda vez que necessário. Havendo necessidade, você poderá ser encaminhado para o HU-USP (Hospital Universitário da USP) ou HC-FMUSP (Hospital das Clínicas). A punção do dedo pode trazer um desconforto moderado devido à picada da agulha. A punção da veia pode trazer um desconforto no braço devido ao aperto pelo garrote e à picada da agulha. Além disso, em alguns casos poderá ocorrer um hematoma (mancha roxa) em seu braço. No entanto, apenas uma punção por sessão ocorrerá para inserir uma cânula na veia; posteriormente, todas as coletas de sangue serão retiradas desta cânula. A biópsia muscular causará um pequeno desconforto de picada no momento da anestesia. Embora sua perna esteja anestesiada (portanto, você não deverá sentir dor), a introdução da agulha de biópsia pode causar incômodo. Esse incômodo é rápido e não deve durar mais do que 2 ou 3 segundos. A biópsia é feita forma limpa e asséptica. Apesar da biópsia ser um procedimento invasivo, nossa equipe é bem experiente e treinada neste procedimento, e não existem relatos de problemas graves associados à biópsia em nosso laboratório. Mesmo assim, havendo necessidade, você poderá ser encaminhado para o HU-USP (Hospital Universitário da USP) ou HC-FMUSP (Hospital das Clínicas). As coletas sanguíneas e biópsias musculares serão realizadas apenas na últimas duas visitas.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE
 Comitê de Ética em Pesquisa

Formulário E

6. Ao participar como voluntário desta pesquisa, você terá acesso a avaliações padrão-ouro do seu estado de saúde e condicionamento físico. Além disso, você terá direito a consultas nutricionais, onde você receberá aconselhamento profissional sobre como pode melhorar seus hábitos alimentares. Você poderá tirar todas as dúvidas que tiver sobre alimentação.
7. Caso você tenha interesse, você também poderá receber aconselhamento de profissionais de educação física sobre como realizar exercícios físicos adequadamente.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas;
2. Você terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, e ainda assim terá acesso aos resultados de todas as avaliações realizadas;
3. Todos os seus dados serão mantidos sob confidencialidade, sigilo e privacidade. Eles poderão ser utilizados para publicações científicas, mas sua identidade nunca será revelada;
4. Estará a sua disponibilidade assistência no HU ou no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Bryan Saunders – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 2648-1337

Bruno Gualano – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 2648-1337

Comitê de Ética em Pesquisa da EEFE-USP – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 3091-3097

Hospital Universitário da USP – Av. Prof. Lineu Prestes, 2565. Butantã Tel:(11) 3091-9200

VI - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

São Paulo, ____ / ____ / ____

 assinatura do sujeito da pesquisa
 ou responsável legal

 assinatura do pesquisador
 (carimbo ou nome legível)

11.3 ANEXO C – Questionário de Avaliação de Efeitos Colaterais à Suplementação de Bicarbonato de Sódio



Suplementação de bicarbonato de sódio



FICHA DE COLETA

COD: _____ SESSÃO: T1SB DATA: _____ PESO: _____

EFEITOS COLATERAIS

0 - Sem problemas ... 3 - Leve ... 6 - Moderado ... 9 - Intenso ... 10 - Muito intenso

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	Dor de cabeça	Sensação de estufamento	Eructação (Arroto)	Dor de estomago	Náusea/enjoo	Vômito	Flatulência	Dor intestinal	Sensação de inchaço	Diarreia
0										
0-90										

O que você acha que tomou? () Bicarbonato de sódio () Placebo

COD: _____ SESSÃO: T2SB DATA: _____ PESO: _____

EFEITOS COLATERAIS

0 - Sem problemas ... 3 - Leve ... 6 - Moderado ... 9 - Intenso ... 10 - Muito intenso

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	Dor de cabeça	Sensação de estufamento	Eructação (Arroto)	Dor de estomago	Náusea/enjoo	Vômito	Flatulência	Dor intestinal	Sensação de inchaço	Diarreia
0										
0-90										

O que você acha que tomou? () Bicarbonato de sódio () Placebo

11.4 ANEXO D – Declaração de Conclusão de Disciplinas e Respectivas Notas

ATESTADO

Atestamos, para os devidos fins que, até o dia 20/10/2021, o(a) senhor(a) Pedro Henrique Lopes Perim, de número USP 10161621, cursou a(s) disciplina(s) abaixo na qualidade de aluno(a) regular do programa de pós-graduação em Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Disciplina: Modelos Estatísticos de Medidas Repetidas Aplicadas à Educação Física

Sigla: EFE5748-3/2 **Carga Horária:** 90 **Conceito:** R **Frequência:** 30 **Créditos:** 0

Início: 11/03/2019 **Término:** 19/05/2019

Disciplina: Biologia do Envelhecimento

Sigla: MCM5881-3/1 **Carga Horária:** 90 **Conceito:** A **Frequência:** 85 **Créditos:** 6

Início: 13/03/2019 **Término:** 23/04/2019

Disciplina: Balanço Ácido-Base do Organismo

Sigla: BMB5769-9/1 **Carga Horária:** 90 **Conceito:** A **Frequência:** 90 **Créditos:** 6

Início: 08/08/2019 **Término:** 17/10/2019

Disciplina: Aplicações e Implicações de Conceitos de Estatística nos Estudos da Educação Física e Esporte

Sigla: EFP5773-2/2 **Carga Horária:** 90 **Conceito:** A **Frequência:** 100 **Créditos:** 6

Início: 05/03/2020 **Término:** 28/05/2020

11.5 ANEXO E - Declaração de Fechamento do Laboratório Devido a Pandemia da COVID-19



OF.ASTAC/00521/EEFE/05.03.2021



Prezados,

Atendendo à solicitação do Prof. Dr. Hamilton Augusto Roschel da Silva, informamos que no âmbito da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em consonância com as determinações do Governo do Estado de São Paulo e da Reitora da Universidade de São Paulo, como estratégia para conter a disseminação do novo Coronavírus, as atividades de pesquisa não essenciais foram suspensas no período de 24/03 a 31/08/2020.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Julio Cerca Serrão

Diretor

À
FAPESP

Av. Professor Mello Moraes, 65
CEP 05508-900 | São Paulo - SP | Brasil
55 11 3091-3084 | www.eefe.usp.br

11.6 ANEXO F -Prêmio 2021 GSSI-ACSM Young Investigator in Sports Nutrition Award

26/10/2021 22:24

Gmail - 2021 GSSI - ACSM Young Investigator in Sports Nutrition Award



Pedro Perim <pedroperim13@gmail.com>

2021 GSSI - ACSM Young Investigator in Sports Nutrition Award

3 mensagens

ACSM Foundation <foundation@acsm.org>
 Para: Pedro Perim <pedroperim13@gmail.com>

5 de maio de 2021 17:00

Pedro Perim
 University of Sao Paulo

Dear Pedro,

CONGRATULATIONS! You've been selected to receive the 2021 GSSI – ACSM Young Investigator in Sports Nutrition Award to support your attendance at ACSM's 66th Annual Meeting taking place June 1-5, 2021!

Your application was selected out of the quality entries by a review panel from ACSM and GSSI. Please let us know if you have already registered for the meeting and need to be refunded. If not, we will work with our meetings department and get you registered. **Please provide a high resolution head shot and completed W-8BEN and wire transfer forms at your earliest convenience.**

We will be in touch with the next steps of the evaluation process and details for the virtual interactive Q & A session for final award placement.

If you have any other questions, don't hesitate to contact us. Congratulations once again, and we hope you enjoy the terrific meeting we have planned!

Very best regards,

ACSM Foundation

2 anexos

Blank W-8BEN.pdf
67K

Blank Wire Transfer Form.docx

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=dcdad21c1b&view=pl&search=all&permthid=thread-f%3A1698949872979249993&siml=msg-f%3A1698949...> 1/2

11.7 ANEXO G -Resultados preliminares de Western Blotting



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT1 no gé1.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT4 no gé1.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT1 no gé2.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT4 no gé2.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT1 no gé3.



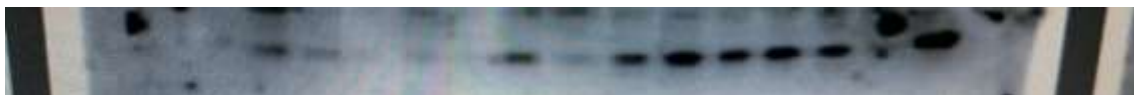
Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT4 no gé3.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT1 no gé4.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT4 no gé4.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT1 no gé1 5.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT4 no gé1 5.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT1 no gé1 6.



Reprodução visual dos resultados de Western Blotting para expressão proteica do MCT4 no gé1 6.

12 REFERÊNCIAS

- BELLINGER MP AND MINAHAN LC. 2016. The effect of β -alanine supplementation on cycling time trials of different length. *European Journal of Sport Science*. 16, (7): 829–836
- BELLINGER PM, MINAHAN C. 2014. Reproducibility of a Laboratory Based 1-km Wattbike Cycling Time Trial in Competitive Cyclists. *Journal of Science and Cycling*. 3(3):23–8.
- BEN-ZAKEN, S., ELIAKIM, A., NEMET, D., RABINOVICH, M., KASSEM, E. & MECKEL, Y. 2015. Differences in MCT1 A1470T polymorphism prevalence between runners and swimmers. *Scand J Med Sci Sports*, 25, 365-71.
- BERGSTROM, J. 1975. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest*, 35, 609-16.
- BONEN, A. 2001. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur J Appl Physiol*, 86, 6-11.
- BONEN, A., MISKOVIC, D., TONOUCI, M., LEMIEUX, K., WILSON, M. C., MARETTE, A. & HALESTRAP, A. P. 2000. Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, E1067-77.
- BORON, W. F. & BOULPAEP, E. L. 2015. *Fisiologia Médica*.
- BOUISSOU, P., DEFER, G., GUEZENNEC, C. Y., ESTRADÉ, P. Y. & SERRURIER, B. 1988. Metabolic and blood catecholamine responses to exercise during alkalosis. *Med Sci Sports Exerc*, 20, 228-32.

- BURKE, L. M. & HAWLEY, J. A. 2018. Swifter, higher, stronger: What's on the menu? *Science*, 362, 781-787.
- CARR, A. J., HOPKINS, W. G. & GORE, C. J. 2011. Effects of acute alkalosis and acidosis on performance: a meta-analysis. *Sports Med*, 41, 801-14.
- COSTILL, D. L., VERSTAPPEN, F., KUIPERS, H., JANSSEN, E. & FINK, W. 1984. Acid-base balance during repeated bouts of exercise: influence of HCO₃. *Int J Sports Med*, 5, 228-31.
- CUPEIRO, R., GONZALEZ-LAMUNO, D., AMIGO, T., PEINADO, A. B., RUIZ, J. R., ORTEGA, F. B. & BENITO, P. J. 2012. Influence of the MCT1-T1470A polymorphism (rs1049434) on blood lactate accumulation during different circuit weight trainings in men and women. *J Sci Med Sport*, 15, 541-7.
- DE OLIVEIRA, L. F., SAUNDERS, B., YAMAGUCHI, G., SWINTON, P. & ARTIOLI, G. G. 2020. Is Individualization of Sodium Bicarbonate Ingestion based on Time to Peak Necessary? *Med Sci Sports Exerc*.
- DE OLIVEIRA LF, DOLAN E, SWINTON PA, DURKALEC-MICHALSKI K, ARTIOLI GG, MCNAUGHTON LR, SAUNDERS B. 2021. Extracellular Buffering Supplements to Improve Exercise Capacity and Performance: A Comprehensive Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Med*.
- DENNIG, H., TALBOTT, J. H., EDWARDS, H. T. & DILL, D. B. 1931. Effect of Acidosis and Alkalosis Upon Capacity for Work. *J Clin Invest*, 9, 601-13.
- DRILLER, M. W., GREGORY, J. R., WILLIAMS, A. D. & FELL, J. W. 2013. The effects of chronic sodium bicarbonate ingestion and interval training in highly trained rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 23, 40-7.
- DUBOUCHAUD, H., BUTTERFIELD, G. E., WOLFEL, E. E., BERGMAN, B. C. & BROOKS, G. A. 2000. Endurance training, expression, and physiology of LDH,

- MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, E571-9.
- FITTS, R. H. 1994. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev*, 74, 49-94.
- FRANSSON D, NIELSEN TS, OLSSON K, CHRISTENSSON T, BRADLEY PS, FATOUROS IG, KRUSTRUP P, NORDSBORG NB, MOHR M. 2017. Skeletal muscle and performance adaptations to high-intensity training in elite male soccer players: speed endurance runs versus small-sided game training. *Eur J Appl Physiol*. 118(1):111-121.
- FROIO DE ARAUJO DIAS, G., DA EIRA SILVA, V., DE SALLES PAINELLI, V., SALE, C., GIANNINI ARTIOLI, G., GUALANO, B. & SAUNDERS, B. 2015. (In)Consistencies in Responses to Sodium Bicarbonate Supplementation: A Randomised, Repeated Measures, Counterbalanced and Double-Blind Study. *PLoS One*, 10, e0143086.
- GAITANOS, G. C., WILLIAMS, C., BOOBIS, L. H. & BROOKS, S. 1993. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol (1985)*, 75, 712-9.
- GREEN HJ, DUHAMEL TA, SMITH IC, RICH SM, THOMAS MM, OUYANG J, YAU JE. 2011. Muscle metabolic, enzymatic and transporter responses to a session of prolonged cycling. *Eur J Appl Physiol*. 111(5):827-37.
- GRGIC, J., RODRIGUEZ, R. F., GAROFOLINI, A., SAUNDERS, B., BISHOP, D. J., SCHOENFELD, B. J. & PEDISIC, Z. 2020. Effects of Sodium Bicarbonate Supplementation on Muscular Strength and Endurance: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Med*.
- HALL, M. M., RAJASEKARAN, S., THOMSEN, T. W. & PETERSON, A. R. 2016. Lactate: Friend or Foe. *PM R*, 8, S8-S15.

- HEIBEL, A. B., PERIM, P. H. L., OLIVEIRA, L. F., MCNAUGHTON, L. R. & SAUNDERS, B. 2018. Time to Optimize Supplementation: Modifying Factors Influencing the Individual Responses to Extracellular Buffering Agents. *Front Nutr*, 5, 35.
- HIGGINS, M. F., JAMES, R. S. & PRICE, M. J. 2013. The effects of sodium bicarbonate (NaHCO₃) ingestion on high intensity cycling capacity. *J Sports Sci*, 31, 972-81.
- HORSWILL, C. A. 1995. Effects of bicarbonate, citrate, and phosphate loading on performance. *Int J Sport Nutr*, 5 Suppl, S111-9.
- HORSWILL, C. A., COSTILL, D. L., FINK, W. J., FLYNN, M. G., KIRWAN, J. P., MITCHELL, J. B. & HOUMARD, J. A. 1988. Influence of sodium bicarbonate on sprint performance: relationship to dosage. *Med Sci Sports Exerc*, 20, 566-9.
- JAMES, L. J., MOSS, J., HENRY, J., PAPADOPOULOU, C. & MEARS, S. A. 2017. Hypohydration impairs endurance performance: a blinded study. *Physiol Rep*, 5.
- JEUKENDRUP, A. 2004. Carbohydrate intake during exercise and performance. *Nutrition*, 7-8, 677.
- JEUKENDRUP, A. E. & CURRELL, K. 2005. Should time trial performance be predicted from three serial time-to-exhaustion tests? *Med Sci Sports Exerc*, 37, 1820; author reply 1821.
- JONES, R. L., STELLINGWERFF, T., ARTIOLI, G. G., SAUNDERS, B., COOPER, S. & SALE, C. 2016. Dose-Response of Sodium Bicarbonate Ingestion Highlights Individuality in Time Course of Blood Analyte Responses. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 26, 445-453.
- JUEL, C. 2001. Current aspects of lactate exchange: lactate/H⁺ transport in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, 86, 12-6.

- JUEL, C., HOLTEN, M. K. & DELA, F. 2004. Effects of strength training on muscle lactate release and MCT1 and MCT4 content in healthy and type 2 diabetic humans. *J Physiol*, 556, 297-304.
- JUEL, C. 1997. Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev*, 77, 321-58.
- KATZ, A., COSTILL, D. L., KING, D. S., HARGREAVES, M. & FINK, W. J. 1984. Maximal exercise tolerance after induced alkalosis. *Int J Sports Med*, 5, 107-10.
- LANCHA JUNIOR, A. H., PAINELLI VDE, S., SAUNDERS, B. & ARTIOLI, G. G. 2015. Nutritional Strategies to Modulate Intracellular and Extracellular Buffering Capacity During High-Intensity Exercise. *Sports Med*, 45 Suppl 1, S71-81.
- LEAN, C. B. & LEE, E. J. 2012. Genetic variations of the MCT4 (SLC16A3) gene in the Chinese and Indian populations of Singapore. *Drug Metab Pharmacokinet*, 27, 456-64.
- LINDERMAN, J., KIRK, L., MUSSELMAN, J., DOLINAR, B. & FAHEY, T. D. 1992. The effects of sodium bicarbonate and pyridoxine-alpha-ketoglutarate on short-term maximal exercise capacity. *J Sports Sci*, 10, 243-53.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- MAINWOOD, G. W. & WORSLEY-BROWN, P. 1975. The effects of extracellular pH and buffer concentration on the efflux of lactate from frog sartorius muscle. *J Physiol*, 250, 1-22.
- MASSIDDA M, FLORE L, KIKUCHI N, SCORCU M, PIRAS F, CUGIA P, CIĘSZCZYK P, TOCCO F, CALÒ CM. 2021. Influence of the MCT1-T1470A polymorphism (rs1049434) on repeated sprint ability and blood lactate accumulation in elite football players: a pilot study. *Eur J Appl Physiol*.

- MATSON, L. G. & TRAN, Z. V. 1993. Effects of sodium bicarbonate ingestion on anaerobic performance: a meta-analytic review. *Int J Sport Nutr*, 3, 2-28.
- MAUGHAN, R. J., BURKE, L. M., DVORAK, J., LARSON-MEYER, D. E., PEELING, P., PHILLIPS, S. M., RAWSON, E. S., WALSH, N. P., GARTHE, I., GEYER, H., MEEUSEN, R., VAN LOON, L. J. C., SHIRREFFS, S. M., SPRIET, L. L., STUART, M., VERNEC, A., CURRELL, K., ALI, V. M., BUDGETT, R. G., LJUNGQVIST, A., MOUNTJOY, M., PITSILADIS, Y. P., SOLIGARD, T., ERDENER, U. & ENGBRETSSEN, L. 2018. IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *Br J Sports Med*, 52, 439-455.
- MCGINLEY, C. & BISHOP, D. J. 2016. Distinct protein and mRNA kinetics of skeletal muscle proton transporters following exercise can influence interpretation of adaptations to training. *Exp Physiol*, 101, 1565-1580.
- MCNAUGHTON, L., BACKX, K., PALMER, G. & STRANGE, N. 1999. Effects of chronic bicarbonate ingestion on the performance of high-intensity work. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 80, 333-6.
- MCNAUGHTON, L. R., SIEGLER, J. & MIDGLEY, A. 2008. Ergogenic effects of sodium bicarbonate. *Curr Sports Med Rep*, 7, 230-6.
- MCNAUGHTON LR. 1992. Bicarbonate ingestion: effects of dosage on 60 s cycle ergometry. *J. Sports Sci.* 10:415-23
- MESSONNIER, L., KRISTENSEN, M., JUEL, C. & DENIS, C. 2007. Importance of pH regulation and lactate/H⁺ transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. *J Appl Physiol (1985)*, 102, 1936-44.
- MUSA-AZIZ, R. 2017. Regulação Renal do Hidrogênio e do pH. In: ATHENEU (ed.) *Tratado de Nefrologia*. Rio de Janeiro.

- NAVANEETHAN, S. D., SINGH, S., APPASAMY, S., WING, R. E. & SEHGAL, A. R. 2009. Sodium bicarbonate therapy for prevention of contrast-induced nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 53, 617-27.
- NUCCIO, R. P., BARNES, K. A., CARTER, J. M. & BAKER, L. B. 2017. Fluid Balance in Team Sport Athletes and the Effect of Hypohydration on Cognitive, Technical, and Physical Performance. *Sports Med*, 47, 1951-1982.
- PATON CD, HOPKINS WG. 2006. Variation in performance of elite cyclists from race to race. *Eur J Sport Sci*. 6(1):25–31.
- PASQUA, L. A., DAMASCENO, M. V., BUENO, S., ARAÚJO, G. G. D., LIMA-SILVA, A. E. & BERTUZZI, R. 2016. Association between Ventilatory Thresholds Related to Aerobic Fitness and MCT1 A1470T Polymorphism. *Sports Nutrition and Therapy*, 1, 5.
- PILEGAARD, H., BANGSBO, J., RICHTER, E. A. & JUEL, C. 1994. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. *J Appl Physiol (1985)*, 77, 1858-62.
- PISCINA-VIÚDEZ X, ÁLVAREZ-HERMS J, BONILLA DA, CASTAÑEDA-BABARRO A, LARRUSKAIN J, DÍAZ-RAMÍREZ J, AHMETOV II, MARTÍNEZ-ASCENSIÓN A, KREIDER RB, ODRIUZOLA-MARTÍNEZ A. 2021. Putative Role of MCT1 rs1049434 Polymorphism in High-Intensity Endurance Performance: Concept and Basis to Understand Possible Individualization Stimulus. *Sports*. 18;9(10):143.
- ROBERGS, R. A., GHIASVAND, F. & PARKER, D. 2004. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287, R502-16.

- ROMERO-CALVO, I., OCON, B., MARTINEZ-MOYA, P., SUAREZ, M. D., ZARZUELO, A., MARTINEZ-AUGUSTIN, O. & DE MEDINA, F. S. 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*, 401, 318-20.
- ROTHSCHILD, J. A. & BISHOP, D. J. 2020. Effects of Dietary Supplements on Adaptations to Endurance Training. *Sports Med*, 50, 25-53.
- SAUNDERS B, ELLIOTT-SALE K, ARTIOLI GG, SWINTON PA, DOLAN E, ROSCHEL H, ET AL. 2017. β -alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 51:658–69.
- SAUNDERS, B., SALE, C., HARRIS, R. C. & SUNDERLAND, C. 2014. Sodium bicarbonate and high-intensity-cycling capacity: variability in responses. *Int J Sports Physiol Perform*, 9, 627-32.
- SAWCZUK, M., BANTING, L. K., CIESZCZYK, P., MACIEJEWSKA-KARLOWSKA, A., ZAREBSKA, A., LEONSKA-DUNIEC, A., JASTRZEBSKI, Z., BISHOP, D. J. & EYNON, N. 2015. MCT1 A1470T: a novel polymorphism for sprint performance? *J Sci Med Sport*, 18, 114-8.
- SIEGLER, J. C., MARSHALL, P. W., BISHOP, D., SHAW, G. & GREEN, S. 2016. Mechanistic Insights into the Efficacy of Sodium Bicarbonate Supplementation to Improve Athletic Performance. *Sports Med Open*, 2, 41.
- SWINTON PA, HEMINGWAY BS, SAUNDERS B, GUALANO B AND DOLAN. 2018. A Statistical Framework to Interpret Individual Response to Intervention: Paving the Way for Personalized Nutrition and Exercise Prescription. *Front. Nutr*. 5:41.