

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



ESTUDO DA RESPOSTA ENDÓCRINA, METABÓLICA E INFLAMATÓRIA E SUA VARIAÇÃO GENÉTICA NO EXERCÍCIO EXAUSTIVO DE LONGA DURAÇÃO: MODALIDADE DE CICLISMO DE MONTANHA.

Isanete Alves de Alonso

Orientador(es): Professor Doutor Manuel Diamantino Pires Bicho

Professor Doutor Luís Bettencourt Sardinha

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências e Tecnologias da Saúde na Especialidade de Nutrição

2018

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



ESTUDO DA RESPOSTA ENDÓCRINA, METABÓLICA E INFLAMATÓRIA E SUA VARIAÇÃO GENÉTICA NO EXERCÍCIO EXAUSTIVO DE LONGA DURAÇÃO: MODALIDADE DE CICLISMO DE MONTANHA.

Isanete Alves de Alonso

Orientador(es): Professor Doutor Manuel Diamantino Pires Bicho

Professor Doutor Luís Bettencourt Sardinha

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências e Tecnologias da Saúde na Especialidade de Nutrição

Júri:

Presidente: Doutor José Luís Bliiebernicht Ducla Soares, Professor Catedrático em regime de *tenure* e Vice-presidente do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Vogais:

- Doutor José Luis Ribeiro Temudo Barata, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior;
- Doutora Ana Margarida Saraiva Valente, Professora Auxiliar da Universidade Atlântica;
- Doutora Cristina Paula Fidalgo Negreiros Monteiro Bento, Professora Auxiliar da Faculdade de Motricidade Humana da Universidade de Lisboa;
- Doutor Manuel Diamantino Pires Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (*Orientador*);
- Doutora Catarina Ferreira Murinello de Sousa Guerreiro Fragoso Mendes, Professora Associada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa;
- Doutor Carlos Manuel dos Santos Moreira, Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Este trabalho foi cofinanciado pela CicloNatur, Liberty Seguros, Laboratório Joaquim Chaves e Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral

Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

ORIENTADOR

Professor Doutor Manuel Diamantino Pires Bicho
Professor Catedrático
Laboratório de Genética
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

COORIENTADOR

Professor Doutor Luís Bettencourt Sardinha
Professor Catedrático
Laboratório de Bem-Estar e Saúde
Faculdade de Motricidade Humana

*Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo.
Mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim.*

Chico Xavier

ÍNDICE

Índice Geral

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Agradecimentos

Prólogo – Apoio Financeiro & Publicações

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

ÍNDICE GERAL

1. Contextualização	3
1.1. Considerações gerais.....	3
1.1.1. História da bicicleta.....	3
1.1.2. Ciclismo de Montanha	10
1.1.3. Exercício exaustivo de longa duração	13
1.1.3.1. Do estado nutricional à composição corporal em provas de longa duração	15
1.1.3.2. Influência sobre os processos imunes e inflamatórios	19
1.1.3.3. Eixo endócrino da interação osso-músculo.....	22
1.1.3.4. Fatores neurotróficos: modulação neuronal	25
1.1.3.5. A variação Interindividual	27
2. Hipótese & objectivos	30
3. Material & Métodos	33
3.1. Arquitetura da prova – conceção do estudo.....	35
3.1.1. Condições do terreno	35
3.2. Estrutura dos atletas	36
3.2.1. Participantes	36
3.2.2. Sistema de <i>Handicaps</i>	37
3.2.3. Gerais, clínicos e fisiológicos.....	37
3.2.4. Antropometria e composição corporal	38
3.2.5. Avaliação nutricional	39
3.2.6. Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	39
3.2.7. Seleção das variantes genéticas	41

3.2.7.1.	Determinação das variantes genéticos	42
3.2.7.1.1.	Determinação dos SNP	42
3.2.7.1.2.	Determinação dos fenótipos da Haptoglobina	43
3.3.	Análise estatística	44
3.4.	Considerações éticas	45
4.	Resultados e discussão	51
4.1.	Ecosistema e estrutura dos atletas	51
4.1.1.	Características da prova	51
4.1.2.	Estruturas dos atletas: características	53
4.1.3.	Composição Corporal, estado nutricional e preparação física	54
4.1.3.1.	Antropometria e Composição corporal	54
4.1.3.2.	Caracterização dos hábitos alimentares	66
4.1.3.3.	Preparação física	74
4.2.	Impacto Imune & Inflamatório	77
4.2.1.	Impacto da ultramaratona de ciclismo de montanha na resposta inflamatória e o catabolismo da hemoglobina	77
4.2.2.	Polimorfismos genéticos funcionais associados com a modulação da resposta imune e catabolismo da hemoglobina	84
4.3.	Eixo endócrino da interação músculo-osso	90
4.4.	Fatores neurotróficos	107
5.	CONCLUSÕES	116
6.	PERSPETIVAS FUTURAS	122
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
8.	APÊNDICES	153
9.	ANEXOS	206

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da evolução das bicicletas, adaptado de Keiko Kobayashi 1993 (Kobayashi K., 1993)	6
Figura 2: As 10 provas ícones de ciclismo de montanha a nível mundial.....	12
Figura 3. Modelo hipotético para o impacto da ultramaratona de ciclismo de montanha TransPortugal nos processos imunes e inflamatórios.	22
Figura 4. Modelo hipotético para o impacto da ultramaratona de ciclismo de montanha TransPortugal na resposta endócrina, metabólica e inflamatória no exercício exaustivo de longa duração.....	28
Figura 5. Conceção do estudo: as avaliações foram realizadas antes (T0) e imediatamente após a prova (T9).....	36
Figura 6. Condições médias de temperatura e humidade durante a ultramaratona de ciclismo de montanha TransPortugal.	51
Figura 7. Efeito cumulativo das altimetrias da ultramaratona de ciclismo de montanha TransPortugal.	52
Figura 8. Nacionalidade representadas na 11ª edição da corrida da TransPortugal. M – Mulheres.	53
Figura 9. Análise Bland-Altman para comparar a percentagem de GC estimada pela aplicação de equações antropométricas e pelo método de BIA.....	56
Figura 10. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de acordo com os polimorfismos HMOX1 e HP em todos os atletas que realizaram a corrida TransPortugal.	86
Figura 11. Comparações de parâmetros hematológicos e bioquímicos de acordo com os polimorfismos HMOX1 e HP para os atletas que completaram as 9 etapas (n=37).	87

Figura 12. Comparações de parâmetros metabólicos e ósseos de acordo com o tempo para completar a prova).....	94
Figura 13. Comparações de parâmetros metabólicos e ósseos de acordo com os polimorfismos dos genes LEP, ADRB2 e BGLAP para os todos atletas).....	98
Figura 14. Comparações de parâmetros metabólicos e ósseos de acordo com os polimorfismos LEP, ADRB2 e BGLAP para os atletas que completaram as 9 etapas (n=37).	99
Figura 15. Esquema da regulação da secreção de insulina pela leptina	104
Figura 16. Comparações dos níveis de BDNF, cortisol e IL-6 para os atletas que completaram e não completaram as 9 etapas.....	110
Figura 17. Esquema hipotético da interação músculo e sistema nervoso simpático.	113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Variantes genéticas relevantes no exercício extenuante e o seu papel funcional. .41	
Tabela 2. Características antropométricas e composição corporal por bioimpedância elétrica antes da prova da TransPortugal.....59	59
Tabela 3: Comparações das medidas antropométricas e composição corporal, obtidas por bioimpedância elétrica antes da prova da TransPortugal, entre atletas que completaram (n=37) em relação aos que não completaram (n=13) os 9 cursos do ultramaratona de ciclismo TransPortugal.....62	62
Tabela 4: Relação das medidas antropométricas e composição corporal, obtidas por bioimpedância elétrica antes da prova da TransPortugal com a velocidade média de terminar a prova.65	65
Tabela 5: Ingestão diária de energia, macronutrientes e constituintes de interesse nos atletas da TransPortugal de acordo com as etapas concluídas.71	71
Tabela 6: Prevalência de inadequação de ingestão de micronutrientes (vitaminas) nos atletas da TransPortugal.....72	72
Tabela 7: Prevalência de inadequação de ingestão de micronutrientes (minerais) nos atletas da TransPortugal.....73	73
Tabela 8: Marcadores hematológicos e metabólicos antes da corrida, pós corrida e de acordo com a magnitude de efeito durante a ultramaratona de ciclismo TransPortugal.78	78
Tabela 9: Comparação entre os atletas que terminaram todas as nove etapas (n=37) e os que não conseguiram completar todas as etapas (n=13) da prova da TransPortugal.83	83
Tabela 10: Composição óssea e marcadores metabólicos antes da corrida, pós-corrida (corrigida para o volume de plasma e a respetiva magnitude de efeito ($\Delta\%$) na Ultramaratona de ciclismo TransPortugal.90	90
Tabela 11: Correlações lineares (r) entre a composição corporal, os marcadores nutricionais, ósseos e metabólicos após a corrida corrigidos pelo volume plasmático.....92	92
Tabela 12: Comparações entre atletas que completaram (n=37) versus os que não completaram (n=13) as nove etapas da ultramaratona de ciclismo TransPortugal95	95

Tabela 13: Razões de risco para prever dois desfechos finais de desempenho na ultramaratona de ciclismo TransPortugal usando o polimorfismo LEP -2548 G> A ajustado para covariáveis relevantes	96
Tabela 14: Fatores neurotróficos e biomarcadores musculares antes da corrida, pós-corrida (corrigida para o volume de plasma e a respetiva magnitude de efeito ($\Delta\%$) na Ultramaratona de ciclismo TransPortugal.	108
Tabela 16: Associação dos níveis do pré-corrida do BDNF e irisina com a velocidade média desempenhada pelos atletas que completaram as 9 etapas da ultramaratona de ciclismo TransPortugal.....	111

AGRADECIMENTOS

Segundo alguns, a gratidão é o mais efémero dos sentimentos do ser humano, e, por esta razão, apraz-me tanto escrever estas palavras...

Tenho muito a agradecer, sinto-me muito afortunada em ter conseguido contar com a ajuda de tantas pessoas que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o culminar desta “epopeia”, que também pode dizer-se aventura. Considero que cada pessoa tem retos pessoais e considero que este foi um dos meus, assemelha-se ao meu EVEREST particular, e confesso que foi, além de vertiginoso, de uma falta de oxigénio em vários momentos, com períodos de instabilidade e de incertezas: a única coisa que praticamente foi inabalável foi a fé e o desejo de querer ver o e acreditar no desfecho deste projeto. Muitas pedras resvalaram da montanha, mas com o apoio e o acreditar também de outros, conseguimos levar a bandeira até ao cimo do mundo, até ao cume do Meu Everest.

E é com lágrimas nos olhos que escrevo esta palavras. E realmente com o coração cheio de emoções.

A ordem destes agradecimentos e comentários não significa rigorosamente nada, pois todas as pessoas aqui mencionadas desempenharam um papel imensamente importante neste projeto.

Quero fazer um agradecimento póstumo à professora Cláudia Marinho, que foi a primeira pessoa que acreditou em mim. Já havíamos desenhado um projeto e havíamos iniciado, inclusive, a recolha de amostras, mas, infelizmente, a vida tomou outro rumo e o projeto terminou. E, desta forma, o meu agradecimento ao Prof. Doutor Manuel Diamantino Bicho, que me acolheu e me permitiu dar asas ao que realmente queria e que me fazia imensamente sentido. Agradeço ao meu Coorientador Prof. Doutor Luís Sardinha, que aceitou participar deste projeto e me orientou na direção correta.

Os meus agradecimentos ao Dr. Calos Cardoso, que nunca duvidou sequer por um momento do projeto e acreditou nele, na sua potencialidade e na vertente não ordinária do mesmo, permitindo-nos fazer todas as análises bioquímicas no laboratório Joaquim Chaves, com custo reduzido, o que foi decisivo para lograr os nossos objetivos.

Agradeço a toda equipa da empresa Ciclonatur, pois, efetivamente, sem o apoio da empresa na figura do seu Diretor, o Sr. António Marval, muito não teria sido possível. O meu agradecimento especial à sua pessoa, pois além de ser o idealizador da TransPortugal, o que aqui já merece os nossos parabéns, por ter desenhado uma prova desta envergadura em Portugal; aceitou a nossa presença e possibilitou a nossa intervenção direta junto dos atletas que, na realidade, são os verdadeiros protagonistas deste projeto.

Montámos um “estaminé”, em cada um dos hotéis, tanto na fase inicial em Bragança como no último dia da prova, em Sagres, carregámos o laboratório às costas, levámos tudo para processar as amostras biológicas de forma imediata, o que nos deu muito, mas mesmo muito trabalho. Trabalhar em campo, é uma situação que verdadeiramente merece respeito, que somente quem já o fez pode valorizar. Assim, os meus agradecimentos aos diretores de ambos os hotéis que nos acolheram e nos facultaram as facilidades de salas de convenções para montar o nosso Laboratório à medida e poder realizar a nossa tarefa.

Igualmente, os meus sinceros agradecimentos ao Dr. José de Souza, diretor da Liberty Seguros, que disponibilizou uma ajuda financeira que nos permitiu cumprir com muitas obrigações que eram necessárias para o desenvolvimento do Projeto, lembro-me de que quando fui pedir o seu apoio com o orçamento na mão, imediatamente acedeu e nos conduziu à equipa financeira. Como comentário adicional, deixo aqui a nota de que, na área, a Liberty Seguros apoia a equipa de ciclismo nacional e tem muitos méritos e acredita no potencial do desporto no país.

O meu agradecimento ao Instituto Bento da Rocha Cabral por colaborar e apoiar financeiramente o projeto, também deixo um agradecimento especial à secretária, a Sra. Paula Faia, que sempre foi muito amável e solícita nas nossas andanças pelo laboratório do instituto aquando da realização dos kits e ensaios aí efetuados.

Agradeço muito, mas muito mesmo, ao apoio dado pela Mestre Ângela Gil no processamento das amostras durante as colheitas tanto em Bragança bem como em Sagres, onde trabalhámos horas e horas a fio. Houve um dos dias em que trabalhámos mais de 25 horas seguidas, sem pausa. Nem nos lembrámos de parar para comer. E

no processamento das amostras feitas *a posteriori* e em todas os momentos do projeto.

Quero agradecer ao Doutor Domingos Henrique que me ajudou a refletir muito sobre o amadurecimento do projeto, que foi um apoio importante e esteve pendente de todo o andamento do mesmo.

Agradeço muito o apoio da Mestre Carolina, que, mesmo não estando presente na fase inicial do projeto, foi de muita ajuda aquando do processamento dos Kits, numa fase mais final, realizado no Laboratório de Genética.

Tenho de agradecer à Dra. Antónia Ferreira que sempre esteve disponível e procurou solucionar as minhas dúvidas e inquietudes durante todo o processo, igualmente aos demais integrantes de toda a equipa do IFA.

Os meus agradecimentos à equipa da AIDFM que esteve sempre disponível aquando da necessidade de consultas e dúvidas. Os meus agradecimentos a toda a equipa de apoio tecnológico no que tange aos computadores e à instalação dos softwares necessários para levar a cabo esta missão.

Um agradecimento especial a Dra. Alda Pereira, que me deu oportunidade de participar numa parte do seu projeto, colaborando em alguns trabalhos.

Quero agradecer ao Doutor José Romero que me dedicou o seu tempo, inteligência e conselhos, fazendo realmente uma consultoria nas duas oportunidades que tivemos juntos.

Outro momento que para mim é de muita alegria é agradecer ao Dr. Ricardo Ribeiro, que me ajudou imensamente e que, apesar de não me conhecer, acreditou no projeto, orientando, polindo arestas e dando muito do seu precioso tempo para discutirmos assuntos. E agradeço também à Prof.^a Doutora Cristina Monteiro que participou no Comité de Tese juntamente com o Dr. Ricardo Ribeiro, ilustrando e verdadeiramente colaborando em pontos que foram cruciais para o desenvolvimento final desta iniciativa. Também agradeço ao Prof. Doutor Brás Nogueira que durante o Comité de Tese ajudou a enriquecer este projeto.

Os meus sinceros agradecimentos à minha família, em especial aos meus sogros que ficaram muitas vezes responsáveis por ir buscar e levar para as respetivas escolas os meus filhos e dar-lhes muitas vezes o almoço e jantar; sem o apoio deles seria

impossível culminar esta tarefa. Muitas vezes confesso que me esquecia de tudo e de todos. Agradeço aos meus pais por me terem dado a oportunidade de estudar, inculcando-me valores fundamentais, fizeram muito de mim, e por estarem, ainda que à distância, a acreditar e a torcer e, de certa forma, a participar nesta faena. Igualmente aos meus irmãos que estarão orgulhosos de mim.

O meu agradecimento ao meu marido que me tem apoiado sempre, nestes tantos anos juntos, que sempre acreditou e me deu “Carta Branca”, para ir e vir, apoiando-me sempre e aturando-me nos maus momentos, com paciência e carinho.

Quero deixar um agradecimento especial à minha filha Victoria, a quem por muitas vezes não lhe dei toda a atenção merecida e necessária, principalmente nestas etapas finais da tese. Ao meu filho Diego, que por vezes não brindei com toda a atenção de que ele necessitava. À minha filha Sofia, que com tenra idade teve de entender que brincaríamos em outro momento, que teve de brincar sozinha enquanto a mamã estava no computador a trabalhar, situações que não são tão simples de compreender.

Agradeço também às minhas amigas, a todas as “Luluzinhas”, que me acompanharam durante este período, agradeço a paciência delas, com as minhas ausências, a todos almoços que faltei, a tantas confraternizações que deixei de comparecer.

E deixo para o final, mas não menos importante, o meu mais profundo e sincero agradecimento à Mestre Andreia Lucas de Matos; realmente as palavras não bastam para agradecer o seu precioso tempo e dedicação, além da paciência que teve comigo, pois estive distanciada do meio académico por muitos anos. A mestre acompanhou este projeto desde o princípio; um pouco a contravento e maré; e apoiou-me desde a ideia inicial e acreditou que poderia ser um projeto interessante e vanguardista, saindo um pouco do trivial, sobretudo para uma Nutricionista. Houve momentos de muita angústia, quando, muitas vezes, sentia verdadeiramente vontade de correr, e, numa conversa, daquelas conversas profundas, deu-me ânimo para seguir em frente, fez-me ter a esperança de ver este projeto finalizado, acreditando em mim, tendo fé em mim, mantendo também a minha fé, e ajudando-me a sentir que valeria a pena. Além de apoiar também “meteu a mão na massa”, e muitas vezes me defendeu e me

AGRADECIMENTOS

orientou. E com este projeto também cresceu uma amizade, daquelas que guardamos no lado esquerdo do peito.

Agradeço a Deus por manter-me com fé e acreditar em algo mais.

Portanto, penso que apesar de a gratidão ser muitas vezes rapidamente esquecida, fica aqui plasmado todo o meu desejo que este sentimento siga presente e inalterado.

Para todos o meu muito obrigado.

PRÓLOGO

– Apoio Financeiro & Publicações –

APOIO FINANCEIRO

Este projeto beneficiou de um cofinanciamento concedido pela CicloNatur, Liberty Seguros S.A., pelo Laboratório Joaquim Chaves e Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral.



Liberty
Seguros



Dr. Joaquim Chaves
LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS
GRUPO JOAQUIM CHAVES

INSTITUTO
DE INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA
BENTO DA
ROCHA CABRAL
FUNDADO EM 1922

PUBLICAÇÕES

Trabalhos publicados sob a forma de artigo original em extenso em revista indexada – anexo

Alonso I., Matos A., Ribeiro R., Gil Â., Cardoso C., Sardinha L. B., Bicho M., “Mountain Cycling Ultramarathon Impacts in Inflammatory and Hemoglobin Responses”. *Med Sci Sports Exerc.* 2017. doi: 10.1249/MSS.0000000000001440.

Trabalhos publicados sob a forma de resumo em revistas nacionais e internacionais indexadas

Alonso I., Matos A., Gil A., Cardoso C., Sardinha L. B., Bicho M., “Bone-to-muscle endocrine axis modulating adaptation to exercise in athletes of mountain cycling in a Portuguese Marathon”, *Endocrine Abstracts*, 2017, Volume 49, ISSN 1479-6848, doi: 10.1530/endoabs.49.EP632

Alonso I., Matos A., Gil A., Afonso C., Cardoso C., Sardinha L. B., Bicho M. “Acute changes in athletes of mountain cycling marathon”, *Revista Portuguesa de Cirurgia*, Suppl. Novembro 2016, p. 35.

Alonso I., Matos A., Gil A., Afonso C., Cardoso C., Silva A. P., Bicho M. Exercício extremo benéfico na obesidade? *Revista Portuguesa de Cirurgia*, Suppl. Novembro 2013, p. 38.

Trabalhos publicados sob a forma de resumo em revistas nacionais não indexadas

Alonso I., Matos A., Afonso C., Gil A., Cardoso C., Silva A. P., Cardoso C., Bicho M. “Extreme exercise, beneficial in obesity? – From pathogenesis to prevention of obesity”, *X PhD Students Meeting*, 30-31 de março e 01 de abril de 2016 – Lisboa (Poster).

Trabalhos apresentados em congressos e em sociedades científicas nacionais e internacionais

Alonso I., Matos A., Gil A., Cardoso C., Sardinha L. B., Bicho M., “Bone-to-muscle endocrine axis modulating adaptation to exercise in athletes of mountain cycling in a Portuguese Marathon”, *19th European Congress of Endocrinology*, 20-23 May 2017, Lisbon, Portugal.

Alonso I., Matos A., Gil A., Afonso C., Cardoso C., Sardinha L. B., Bicho M. “Acute changes in athletes of mountain cycling marathon”, *20.º Congresso SPEO*, 18-20 de novembro 2016 – Porto (Oral).

Alonso I., Matos A., Gil A., Afonso C., Cardoso C., Silva A. P., Bicho M. Exercício extremo benéfico na obesidade?, *17.º Congresso SPEO*, 22-24 de novembro de 2013 – Porto (Poster).

RESUMO

O presente estudo pretendeu analisar a resposta endócrina, metabólica e inflamatória resultante de um exercício extremo de longa duração.

Estudaram-se 55 ciclistas de montanha amadores, homens e mulheres, entre os 25 e 60 anos. Caracterizou-se a composição corporal, a condição física e os hábitos nutricionais dos atletas.

Os atletas realizaram uma prova de ciclismo de montanha, a TransPortugal, que atravessa Portugal de norte a sul, durante nove dias consecutivos.

Quantificaram-se parâmetros hematológicos, metabólicos, de lesão muscular e associados ao metabolismo ósseo, antes e logo após a prova. Posteriormente, e de acordo com as características da prova, os atletas foram classificados em dois grupos, tendo em conta as etapas que realizaram (9 etapas *versus* <9 etapas), o tempo e velocidade para realizar a mesma.

Em resposta ao exercício, verificou-se uma maior capacidade fisiológica adaptativa e homeostática para os atletas que realizaram todas as nove etapas. Em resposta a este exercício, estes atletas desenvolveram um perfil possivelmente mais adaptado às exigências do exercício e ao impacto das variações substanciais dos parâmetros hematológicos, biomarcadores musculares e do metabolismo ósseo. Determinadas variantes genéticas polimórficas relacionadas com as vias referidas anteriormente, que estiveram associadas com o desempenho, poderão servir de linhas orientadoras para os atletas que compitam, especificamente em provas extenuantes de longa duração.

Este trabalho suporta a hipótese da influência de uma ação comodulatória entre fatores genéticos e mediadores libertados durante um exercício extenuante por longos períodos de tempo.

Palavras-chave: Exercício extenuante de longa duração, efeitos sistémicos, homeostasia, desempenho.

ABSTRACT

The present study intends to analyze the endocrine, metabolic and inflammatory response in from an extreme long-term exercise.

A total of 55 amateur mountain bikers, men and women, were studied between the ages of 25 and 60 years. Body composition, physical condition and nutritional habits of the athletes were characterized.

The athletes performed a mountain cycling race, TransPortugal, which crosses Portugal from north to south, during nine consecutive days.

Hematological, metabolic, muscle injury and bone metabolism parameters were quantified before and immediately after the race. Afterwards, and according to the characteristics of the test, the athletes were classified into two groups taking into account the courses they performed (9 courses *versus* <9 courses), the time and speed to perform the same.

In response to exercise, there was a greater physiological adaptability and homeostatic capacity for the athletes who performed all 9 courses. In response to this exercise, these athletes developed a profile possibly more suited to the demands of exercise and the impact of the substantial variations of hematological parameters, muscle biomarkers and bone metabolism. Certain polymorphic genetic variants related to the above-mentioned pathways that have been associated with performance may serve as guidelines for competing athletes, specifically in long-term strenuous races.

This work supports a hypothesis of the influence of a co modulatory action between genetic factors and mediators released during a strenuous exercise for long periods of time.

Key-words: Long-term strenuous exercise, systemic effects, homeostasis, performance.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
5HT2A	Recetor da Serotonina
5HTTLPR	Transportador da Serotonina
5HTVNTR	Transportador da Serotonina
AACR	Aminoácidos de Cadeia Ramificada
ACT	Água Corporal Total
ADRB2	Recetor Beta Adrenergico
AEC	Água Extracelular
AGL	Ácidos Gordos Livres
AI	Adequate Intake
AIC	Água Intracelular
ALT	Alanina Transaminase
AM	All Montain
AMP	Proteínas Antimicrobianas
AMDR	Acceptable Macronutrient Distribution Range
AODCR	Ácido Cetoácido Desidrogenase de Cadeia Ramificada
AST	Aspartato Transaminase
ATP	Trifosfato de Adenosina
DMO	Densidade Mineral Óssea
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BGLAP	Osteocalcina
BIA	Bioimpedância
BTT	Bicicleta Todo Terreno
CAT	Catalase
CD163	Recetor solúvel
CHO	Carboidratos
CPL	Ceruloplasmina
CRH	Corticotrofina
CRP	Proteína C Reativa
DEXA	Radioabsormetria de Dupla Energia
DRI	Dietary Reference Intake
EAR	Estimated Average Requirement
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPO	Eritropoietina
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food And Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)

ABREVIATURAS

FNDC5	Domínio de Fibronectina tipo III
FP	Ferroportina
FPCUB	Federação Portuguesa de Cicloturismo e Utilizadores de Bicicleta
FR	Free Ride
GC	Gordura Corporal
GED	Gasto Energético Diário
GGT	Gama Glutamil Transferase
Gla-OC	Osteocalcina Descaboxilada
Glu-OC	Osteocalcina Carboxilada
GPS	Sistema de Posicionamento Global
GPx	Peroxidase do Glutathione
GS	Glutathione Total
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hipocromia Eritrocitaria
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HMOX1	Hemeoxigenase
HOMA IR	Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina
HOMA β	Modelo de Avaliação da Homeostase das Células Beta
HP	Haptoglobina
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitaria-Suprarenal
Ht	Hematócrito
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase
IL -6	Interleucina 6
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IMC	Índice de Massa Corporal
IOM	Institute of Medicine
IPAM	Instituto Português de Mar e Atmosfera
IQR	Intervalo Interquartil Range
LDL	Lipoproteína de baixa Densidade
LEP	Leptina
MAO-A	Monoamina Oxidase A
MCH	Hemoglobina Corpuscular Media
MG	Massa Gorda
MLG	Massa Livre de Gordura
MME	Massa Muscular Esquelética
MMO	Massa Mineral Óssea

MTB	Bicicleta de Montanha
MUM	Mountain Ultra Marathon
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEGF	Fator de Crescimento derivado da Placenta
PGC	Coativador do Cofator Gama do Peroxissoma
PGC1- α	Coativador dos Cofatores Proliferadores 1 alfa do Peroxissoma
PPAR- α	Recetor ativado por proliferadores dos peroxissomas gama 1 alfa
PV	Volume Plasmático
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
QSD	Questionário Sociodemográfico
RDA	Recommended Dietary Allowances
RDW	Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
RGSH	Redutase do Glutathione
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SNPs	Polimorfismo de um Único Nucleotídeo
SOD	Superóxido dismutase
TMB	Taxa Metabólica Basal
TMM	Tecido Mole Magro
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UMM	Ultramaratona de Montanha
VCM	Volume Corpuscular Médio
VET	Valor Energético Total
XC	Cross-Country

CAPÍTULO I

- Contextualização -

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

É do conhecimento geral que o exercício físico regular tem efeitos benéficos para o estado fisiológico, metabólico e imunológico. Melhora, principalmente, o bem-estar e traz alívio de doenças relacionadas com o estilo de vida, como a obesidade, diabetes, dislipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares (Silverman & Deuster, 2014). Além disso, há um crescente interesse em desportos competitivos, cujo esforço se aproxima dos limites das habilidades e das capacidades físicas e psicológicas dos atletas (Hoffman & Krishnan, 2013; Joyner & Coyle, 2008). O treino e a realização deste tipo de atividade induzem a um estado de homeostasia, para melhorar a adaptação dos indivíduos para a realização destes desportos radicais (Lesinski, Hortobágyi, Muehlbauer, Gollhofer, & Granacher, 2015).

É necessário entender o desporto como um todo e um dos protagonistas deste trabalho é a própria bicicleta, com a sua história evolutiva, além dos próprios atletas.

1.1.1. HISTÓRIA DA BICICLETA

A palavra deriva do grego: *bi* (dois) e *kyklos* (rodas) – no inglês *bicycle*, para o francês *bicyclette* – e foi adaptada ao castelhano como “bicicleta” e assumida pelo português de igual forma. Para os que têm reservas ou não são adeptos do ciclismo, são válidas algumas considerações.

As primeiras descrições do que se poderia associar ao que hoje conhecemos como bicicleta remontam a 1690; alguns autores defendem que foi uma das invenções de Leonardo da Vinci e que se encontra no *Códex Atlanticus* (Zammattio, 1980). Outros autores de maneira veemente negam estas afirmações. Descrevem que Eric Richard construiu, na Europa, um pequeno carro movido por alavancas manuais e que Jacques Ouzanon melhorou a versão de Eric Richard, colocando umas alavancas nos pés. O que é certo é que o Barão Karl Freiderich Von Drais, na Alemanha, trabalhou num veículo, completando o que foi criado pelo Conde Mède de Sivrac, e acoplado um

guiador, através da montagem de um eixo móvel na roda dianteira e que este novo veículo passou a chamar-se *Draisana* (Scalzo *et al.*, 2014)

De facto, a diversidade de bicicletas conhecidas atualmente é espelho de um longo processo evolutivo que remonta a 1818 (Figura 1). Estas importantes modificações e o processo evolutivo concomitante permitiram o surgimento de um enorme leque de variedades de bicicletas e tipos de provas.

O Barão Karl Friederich Von Drais patenteou a bicicleta em Baden e em outras cidades europeias no dia 12 de janeiro de 1818. Os raios de madeira foram substituídos por raios de ferro em 1868. Datam de 1869 os relatos das primeiras corridas, na França, entre Toulon-Caraman-Toulon, com uma distância de 34 km, que foi ganha pelo ciclista Letour. A bicicleta pesava 50 kg e o percurso foi feito em 3 horas. Em 1855, o francês Ernest Michaux adaptou à draisana uns pedais na roda dianteira, transformando-a então num velocípede. O senhor Michaux tinha uma fábrica de carrinhos para bebés que adaptou ao fabrico de bicicletas, conseguindo então no ano de 1862 um impulso industrial importante com a fabricação de 142 unidades em 12 meses.

Em 1869, dá-se início às competições com uma outra corrida que contou com um número bastante importante de integrantes (212 corredores). Realizou-se entre as cidades de Rouen e Paris, tendo sido ganha pelo inglês James Moore, que percorreu 123 Km em 10 horas, e promovida por *Le Velocípede Illustré*, jornal fundado no dia 1 de abril de 1869, por Richard Lesclide, editado em Paris, e que foi o pioneiro do jornalismo desportivo na França. Assim começou o ciclismo desportivo. Posteriormente, em 1870, Belvalette inventa os travões de mola. Meyer consegue colocar umas bandas de borracha maciça sobre as rodas que serão depois substituídos pelos atuais pneus, além de diversas outras melhorias que surgiram a partir daquele modelo rústico da bicicleta, como o quadro triangular inventado por Humbert em 1884 (Roberts, 1991; Skriver *et al.*, 2014).

Desde que foi inventada, a bicicleta tem vindo a sofrer, ao longo destes dois séculos, muitas alterações. A bicicleta tornou-se mais moderna, evoluiu, ficou mais eficiente, versátil e, sobretudo, entrou na era da tecnologia. A bicicleta sempre foi vista como um meio de transporte alternativo. Por volta da década de 70, com a crise petrolífera, o americano Gary Fischer considerou que o momento era oportuno para apostar numa

nova bicicleta, diferente da que se usava até ao momento e que tinha como objetivo melhorar o trânsito das grandes cidades. Gary Fischer, como amante do tema e além de ter uma visão da utilidade da bicicleta como transporte alternativo, foi mais longe e percebeu que a bicicleta poderia ter uma repercussão na saúde pessoas. Além disso, traria benefícios ambientais importantes. Aliado a tudo isso, procurava-se que a bicicleta também servisse como uma atividade de lazer e prazer, que pudesse sair das ruas da cidade e ir até ao campo, para passeios de fim de semana com um espírito mais bucólico e relaxado.

Naquela altura só havia um tipo de bicicleta no mercado que podia ser usado na estrada e fora dela, existiam as bicicletas de corrida, mas não permitiam então a opção de passeio. Desta forma, Gary Fischer, Tom Ritchie, além de Joe Bree e Charlie Cunningham, deram início ao novo conceito de bicicleta, que permitia circular em qualquer estrada, surgindo a bicicleta todo terreno (BTT). Ignaz Schwinn construiu um primeiro modelo, denominado de *Mountain Bike* (bicicleta de montanha), que não teve grande sucesso principalmente devido ao peso: eram bicicletas em ferro, robustas e fortes, mas muito pesadas. Posteriormente, as bicicletas passaram a ser fabricadas em alumínio e atualmente utiliza-se o titânio Kevlar® (trata-se de um polímero resistente ao calor e cinco vezes mais resistente do que o aço por unidade de peso), a grafite e a fibra de carbono, que são materiais muito mais leves e bastante mais resistentes.

Foram surgindo muitas outras inovações como a inserção de amortecedores, quadros com diferentes geometrias, acoplado o guiador para triatletas com extensões de apoio para os antebraços, e uma complexidade de acessórios como as mudanças automáticas, feitas pela fábrica *Shimano*, o sistema *Dura-ace Di2* ou até mesmo a tecnologia *e-tap*, onde a bicicleta já não tem nenhum cabo visível e as mudanças nas marchas são realizadas através dos dispositivos de *Bluetooth* com o objetivo de satisfazer as exigências de um novo mercado cada vez mais exigente em relação à praticidade, estética e à própria performance do atleta e da bicicleta.

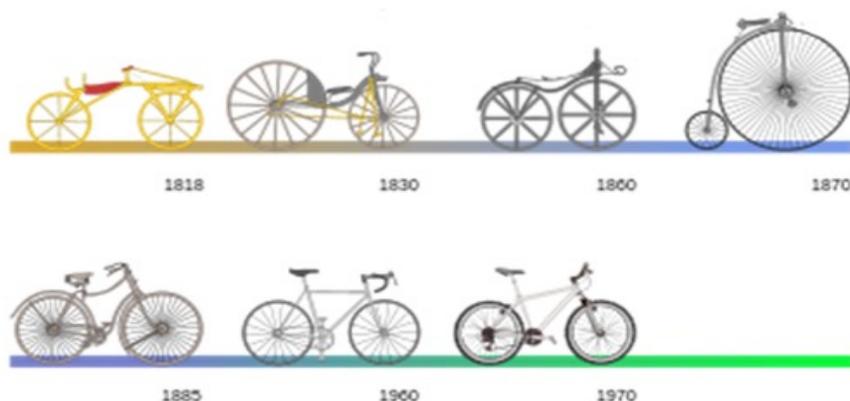


Figura 1: Esquema da evolução das bicicletas, adaptado de Keiko Kobayashi 1993 (Kobayashi K., 1993).

Quanto, à modalidade, esta cresceu de tal maneira que passou a fazer parte dos Jogos Olímpicos de Atlanta em 1996.

Relativamente a Portugal, em 1987 nasce a Fundação Portuguesa de Ciclismo e Utilizadores de Bicicleta (FPCUB). Esta é uma entidade coletiva, composta por mais de 1200 associações e clubes, que representa cerca de 30 000 pessoas. Nessa altura, José Manuel Caetano entra em contato com a nova bicicleta de montanha nos Estados Unidos e introduz este conceito no país, dando início aos primeiros passos da bicicleta todo terreno (BTT) ou da bicicleta de montanha (MTB) em Portugal.

Assim surge o novo conceito, onde o objetivo é ultrapassar obstáculos, realizar percursos com irregularidades, onde se pode optar por trilhos de terra batida, em parques, no campo ou mesmo nas cidades, e se necessita de destreza, concentração, autossuficiência. A modalidade BTT proporciona longas distâncias em locais com um caráter de aventura e distantes das zonas onde passam estradas para carros. A bicicleta todo terreno leva-nos onde um carro não nos pode levar e permite-nos descobrir um mundo de aventura. Com esta filosofia aumentam os adeptos e iniciam-se as competições. Nestes tempos a evolução das bicicletas leva ao aprimoramento da biomecânica e da anatomia da própria bicicleta, surgem várias modalidades e para cada modalidade um tipo de bicicleta diferente.

Caminhar e correr são os modos mais comuns para nos locomovermos no dia a dia, longe dos eventos competitivos e desportivos. Das mais eficientes formas de

locomoção que temos à disposição para o ser humano, à parte dos meios de transporte em que se utiliza um motor com combustível, o ciclismo é aquele que permite a movimentação, com uma poupança de energia e requerendo menos energia por unidade de massa e por unidade de distância do que qualquer outro meio de transporte (Brooks, 1989).

As modalidades mais conhecidas são:

Cross-Country – XC: estas são bicicletas com uma geometria que mantém uma rigidez maior, possuem apenas uma suspensão dianteira com aproximadamente 80-100 mm, pode ser com mola de ar, mola com elastômero, mola com óleo ou pneumática. Os quadros são resistentes, porém muito leves, utiliza-se o alumínio e a fibra de carbono na sua confecção. Pesam aproximadamente 9 Kg.

All-Mountain – AM: nesta categoria, como o próprio nome indica, são bicicletas preparadas para todos os terrenos, têm dupla suspensão, com a suspensão traseira que permite uma redução importante no impacto, resultando numa relação de maior conforto para enfrentar os obstáculos, permitindo um controle melhor da bicicleta. O percurso da suspensão dianteira pode ser de 120-160 mm, permitindo ao ciclista saltar tanto em altura como transpor obstáculos, com maior precisão, e sem comprometer a eficiência do movimento. Os quadros são ainda mais reforçados para assimilar as quedas e saltos, o peso é ligeiramente maior justificado pela eficiência da bicicleta, que pode ter 13 kg.

Free-Ride – FR: esta modalidade apresenta uma bicicleta bastante diferente com aproximadamente 18 kg, também tem dupla suspensão, mas a suspensão dianteira pode chegar aos 180 mm, apresentam um tubo de assento bastante mais baixo, o que faz com que o centro de gravidade do ciclista seja mais próximo do chão, fator que afeta o controle da bicicleta, e a sua geometria é totalmente modificada comparativamente à geometria das outras modalidades. Esta bicicleta serve para subir ou escalar terrenos difíceis, mas também é muito eficiente nas descidas, muito utilizada para andar em trilhos de madeira por cima das árvores, normalmente mantém o tamanho das rodas em 26 polegadas.

Down-Hill – DH: nesta modalidade o percurso é sempre em descida, com caminhos muito irregulares, poucas retas, com muitos saltos, vãos livres, onde o ciclista deve

transpor estes obstáculos muitas vezes sem ajuda de rampas e muitos degraus, e em que este se deixa cair para poder vencer o obstáculo. Devido ao facto de esta modalidade ser bastante mais agressiva, o ciclista deve usar um capacete fechado, como o das motos, que protege o queixo, além de usar material de proteção especial como caneleiras, joelheiras, cotoveleiras e colete com proteção para a coluna.

À medida que avançamos nas categorias, as bicicletas vão ficando cada vez mais pesadas, com mais dificuldade no pedalar e no próprio controlo, o que afeta também o desgaste do ciclista, que deve ter uma força física maior para afrontar estas circunstâncias. Outra situação importante no que se refere ao design das bicicletas é que atualmente as bicicletas de ciclismo de montanha apresentam a possibilidades de ter duas suspensões, diferentemente do ciclismo de estrada que não tem suspensão, uma dianteira, que é normal e que define o que foi dito anteriormente e uma suspensão traseira que possibilita uma maior absorção do impacto, auxiliando na resposta corporal de modo a que este sofra de forma menos agressiva as variações bruscas do terreno. Por um lado, quando as bicicletas têm dupla suspensão, o peso sobe consideravelmente, o que não é tão positivo, mas por outro, torna a atividade mais confortável; este é o preço que se paga pelo conforto. Além de que deve ser considerado que as bicicletas com dupla suspensão poderiam ser menos rápidas e agressivas que as bicicletas com uma única suspensão dianteira.

Os atletas de elite normalmente correm com bicicletas de todo terreno só com uma suspensão dianteira, pela busca incessante do tempo, na competição. No entanto, para corridas de vários dias, como no caso das ultramaratonas, muitas vezes procura-se um pouco mais de conforto, optando-se por bicicletas de dupla suspensão. Estas modalidades têm um grau de exigência e esforço físico diferente para o ciclista, que tem de ser robusto e forte para poder controlar todos estes fatores além de carregar o próprio peso, a bicicleta e o equipamento

Cada uma destas modalidades citadas tem algumas características próprias, cujas modificações têm sido feitas com o objetivo de tornar as bicicletas o mais competitivas possível dentro dos seus próprios nichos. Os pneus passaram a ser mais largos e cardados, ou seja, utilizam uns cravos com alturas diferentes que permitem uma maior aderência em terrenos com lama, barro, areia, cascalho e pedras, absorvem impactos

e apresentam maior tração, têm medidas de normalmente 1,8” e 2,2” para o XC, e de 2,0” a 2,4” para o FR, AM e DH. Por ser um pneu com estas características, no asfalto apresenta um baixo desempenho. Outro aspecto a modificar-se atualmente é o guiador, que apresenta diversos formatos: retos, curvos, com diferentes angulações com as suas vantagens e desvantagens. Relativamente às rodas, há ainda muita intranquilidade neste aspeto; inicialmente eram de 26 polegadas, com aros de parede dupla, que impedem as deformações aquando da passagem de obstáculos. Nos últimos anos há um crescente interesse pela modificação no tamanho das rodas que passam de 26” para aros de 29” e de 27,5”. No XC, é mais comum o uso de bicicletas com rodas de 29”, sobretudo para a realização das ultramaratonas, pois pensa-se que as rodas de dimensões um pouco maiores são mais efetivas para o desenvolvimento em longos percursos, além de transporem obstáculos de forma mais facilitada. Uma novidade que vem movimentando os mercados são os pneus ultra dimensionados, os chamados *fat's* ou *plus*, entre 2,8” até 4,2”, estes estão a ser usados para competições na areia ou na neve.

Outra tendência de mercado nos últimos anos e que veio para ficar é em relação às mudanças. Normalmente as bicicletas variam entre as 18 e as 21 mudanças, ou seja, um carreto ou catraca com 9 a 11 discos, na parte traseira e um pedaleiro com dois discos de maior tamanho. A tendência é em vez de grupos de mudanças com dois discos ou coroas (2 × 9 ou 2 × 10) passar-se a utilizar apenas um disco na parte dianteira menor com 11 mudanças no carreto ou catraca (1 × 11). Esta modificação foi introduzida no mercado em 2013 e mantém-se, cada vez com mais adeptos.

Relativamente ao equipamento na modalidade de bicicleta de montanha, é obrigatório o uso de capacete, luvas, mochila onde se carregam partes e peças, como bomba de ar comprimido, insuflador, câmaras suplentes, “kits de ferramentas” e saco para colocar água. Nas competições, os atletas devem ter autonomia, saber de mecânica para a resolução de problemas e ter consigo as peças suplentes mais comuns, fator que afeta também o peso final do conjunto e o desgaste do próprio atleta.

A combinação perfeita do atleta e da bicicleta forma um conjunto que produz como resultado o desempenho, e este conjunto está dependente de muitos fatores que poderão influenciar o resultado final. Estes fatores, nomeadamente, serão fisiológicos

(consumo máximo de oxigénio pelo atleta (VO_2 máx), limiar do lactato, eficiência muscular), ambientais (velocidade do vento, temperatura, humidade, altitude, tipo de terreno) e mecânicos (tipo e modelo da bicicleta, tipo e dimensão dos pneus, componentes) (Jeukendrup, Craig, & Hawley, 2000). Por esta razão é tão importante salientar os avanços e toda a investigação que vem surgindo nos últimos anos com o objetivo de melhorar o desempenho dos atletas e superar os seus próprios limites.

Apesar do recente sucesso deste tipo de competições de ultramaratonas, particularmente na Europa, as consequências fisiológicas ainda não estão completamente esclarecidas. Os atletas apresentam diferenças significativas nos seus antecedentes de treino e de capacidades individuais. Vários autores sugerem que estas atividades e competições relacionadas podem ser consideradas potenciais ameaças à saúde com o desenvolvimento de lesões musculares, cardíacas, renais e anemia entre outras, relacionadas com o exercício exaustivo de longa duração (Chiu *et al.*, 2015; Comassi *et al.*, 2015).

1.1.2. CICLISMO DE MONTANHA

Dentro das provas de ciclismo podem comentar-se dois tipos de competições: o ciclismo de estrada e o ciclismo de montanha. O ciclismo de estrada realiza-se em grandes distâncias e em terrenos normalmente asfaltados, com a bicicleta de estrada, cujo peso ronda os 8-9 kg, pneus finos, lisos, com uma geometria especialmente desenhada para ganhar velocidade no asfalto, e onde o nível de exigência física é extremamente alto e as altimetrias são totalmente variadas. Estas provas são de longas distâncias e podem ser por etapas, como as provas clássicas do ciclismo: *Tour de France*, *El Giro d'Itália*, a *Volta de Portugal* e *La Vuelta a España*. Nestas provas os representantes são do sexo masculino. E normalmente nestas circunstâncias o grau de impacto é menor quando comparado com o ciclismo de montanha. No ciclismo de pista, onde as competições são feitas em velódromo com piso de cimento ou de madeira, o objetivo é realizar um determinado número de voltas e ganha quem efetuar o percurso em menor tempo.

O ciclismo de montanha tem muitos mais competidores e apresenta provas com distâncias normalmente mais curtas, visto que o terreno é muito diverso, com piso de terra, pedra, areia, cascalho ou relva, e em função da velocidade que pode ser alcançada. Esta modalidade chama-se *all terrain mountain bike* ou bicicleta todo o terreno (BTT). É importante entender que mesmo dentro do que se conhece como ciclismo de montanha, existem várias categorias, as corridas muitas vezes são realizadas num circuito, e que devem ser dadas um número de voltas estipuladas, como o que acontece nas Olimpíadas, o circuito normalmente tem um grau de dificuldade elevado com muitos obstáculos que obrigam ao ciclista ter uma técnica e perícia perfeitas. Outra modalidade é as ultramaratonas, que compreendem competições com distâncias bastante longas que são realizadas num só dia, e ainda as ultramaratonas por etapas, onde o percurso é feito por etapas com distâncias longas, normalmente com uma média de oito dias de corrida, onde existe uma organização dedicada para dar acolhimento e uma logística bastante complicada para acomodar todos os atletas em função de alojamento e restauração, além de atendimento médico e outros cuidados necessários para o desenvolvimento deste tipo de atividades.

O ciclismo da modalidade de estrada é uma das disciplinas mais difíceis do desporto, devido ao tipo de treino e de competição. Além de ter uma temporada competitiva de longa duração, alto nível de competição e uma seleção com atletas de alto nível que resulta em apenas cerca de 800 profissionais em todo o mundo. Já as corridas de ciclismo de montanha aglutinam cerca de 1200 atletas nas competições mais conhecidas, como no Cape Epic e na grande maioria são atletas amadores.

Dentro do ciclismo de montanha existem 10 provas que são ícones dentro da modalidade, distribuídas por todo o mundo e com uma grande procura (Figura 2).

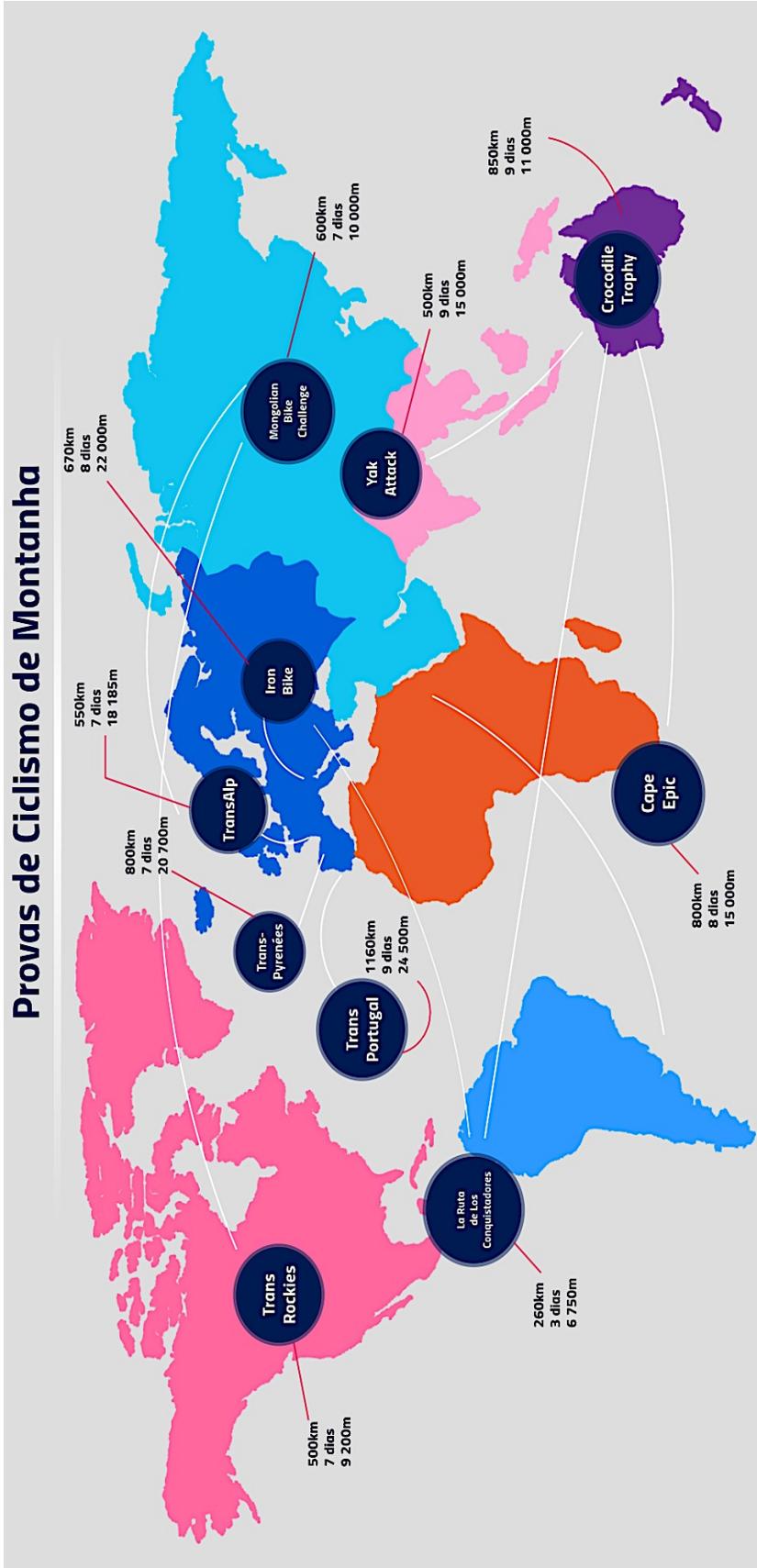


Figura 2: As 10 provas ícones de ciclismo de montanha a nível mundial.

Iron Bike na Itália entre os Alpes italo-franceses, na região do Piemonte, no mês de julho; **Trans-Pyrenées Coast to Coast**, na Espanha, que cruza os Pirenéus até ao Mediterrâneo, no mês de julho; **Yak Attack** nos Himalaias, sendo a maior corrida de bicicleta de montanha realizada com altitudes de 5416 m acima do nível do mar e uma amplitude térmica de +30°C a -20°C, em novembro; **Crocodile Trophy** na Austrália (22.ª edição), homologada pela UCI (Union Cycliste Internationale), em autonomia, em outubro; **Cape Epic** na África do Sul, em março; **TransPortugal** em Portugal; atravessa o país de norte ao sul, de Bragança a Sagres, no mês de maio; **Mongolian Bike Challenge** na Mongólia, começa e termina na região de Ullan Battar, em agosto; **La Ruta de Los Conquistadores** na Costa Rica, atravessa o país de costa a costa, do Pacífico ao Atlântico, de um grau de dificuldade extremo, atravessa vulcões e terrenos de lama e barro, floresta tropical, com 6750 m de altitude acumulada e uma amplitude térmica importante de 38°C a 14°C e 95% de humidade relativa, em outubro; **Trans Rockies** no Canadá; no meio das Montanhas Rochosas, modalidade Singletrack e temperaturas amenas, entre julho e agosto; **TransAlp** na Alemanha; inicia-se em Mayrhofen e termina no Lago Di Garda, em Riva Di Garda na Itália, cruzando partes alpinas da Alemanha, Áustria e Itália, com temperaturas máximas de 40°C, em julho.

1.1.3. EXERCÍCIO EXAUSTIVO DE LONGA DURAÇÃO

Exercícios aeróbicos de moderada intensidade que englobam a caminhada, os alongamentos, os exercícios de resistência e mistos, consideram várias atividades de forma regular e habitual com uma duração normal entre 30-60 minutos, com o objetivo de restaurar o bem-estar e promover um aprimoramento importante no humor.

Estudos recentes apontam para estes benefícios do exercício moderado. O estudo do grupo de Tozzi *et al.* avaliou um grupo de indivíduos sedentários que iniciaram atividades físicas por um período de 16 semanas em relação a um grupo controlo sem atividade. O grupo exposto ao exercício apresentou modificações consideráveis, identificadas por ressonância magnética, com uma maior atividade nas zonas cerebrais (Tozzi *et al.*, 2016). O exercício moderado revela-se eficaz no alívio dos sintomas depressivos e pode ter efeitos semelhantes nos inibidores seletivos da recaptura de serotonina (5-HT) (Rethorst, Landers, Nagoshi, & Ross, 2011).

O exercício regular pode induzir efeitos positivos no atleta que pode experimentar uma adaptação, reduzindo-se o stress oxidante e, portanto, uma homeostasia do sistema redox, um efeito anti-inflamatório, com o ajuste de nível de cortisol e também com o objetivo de fornecer regeneração aos tecidos (Di Raimondo *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que o exercício regular, quando realizado de forma consistente, altera o comportamento e está associado às escolhas mais saudáveis, afetando diretamente comportamentos de risco, como hábitos tabágicos, alcoolismo e excessos alimentares (Wasson, 2014). Os benefícios do exercício regular ainda incluem a diminuição da deficiência cognitiva relacionada com a idade (Bherer, Erickson, & Liu-Ambrose, 2013), a melhoria da sintomatologia e manutenção do tratamento na síndrome de cólon irritável (Johannesson, Simren, Strid, Bajor, & Sadik, 2011) e a prevenção de cancros (Moore *et al.*, 2016), como o cancro de cólon (Robsahm *et al.*, 2013).

Um biomarcador-chave que tem sido associado ao exercício regular é o recetor 1-alfa do recetor gama ativado pelo proliferador de peroxissomas (PGC-1 α) e a relação interórgãos a partir da ativação do PGC1-alfa e a sua relação com outros órgãos e tecidos, como o tecido cerebral, o tecido ósseo, o tecido adiposo e o fígado (Hawley, Hargreaves, Joyner & Zierath, 2014).

Nos últimos anos, o estudo do microbioma tem sido apontado como um verdadeiro aliado no exercício. De facto, o exercício regular a moderado promove uma menor permeabilidade intestinal, impedindo a translocação bacteriana, devido à manutenção da espessura da mucosa intestinal, à produção de proteínas antimicrobianas (AMP) e à expressão génica no tecido intestinal (O'Sullivan *et al.*, 2015). Uma flora microbiana adequada, com melhoria na diversidade do microbiota, poderá vir a ser um marcador de estado saudável (Clarke *et al.*, 2014).

Tal como foi descrito, o exercício regular tem-se apresentado como um verdadeiro aliado na manutenção de uma vida saudável. Contudo, quando a homeostasia de cada indivíduo é perturbada, o organismo é forçado a tentar repor esse equilíbrio. Nesta perspetiva, e a par dos benefícios do exercício regular, exercícios extremos poderão acarretar compromissos extremamente importantes e consideráveis para o organismo.

Quando as atividades competitivas excedem as durações normais das várias modalidades, como, por exemplo, nas maratonas, em que se consideram os 42 195 km, convertem-se nas chamadas ultramaratonas. As ultramaratonas de montanha (MUM) consistem em correr a pé em trilhos de montanha com distâncias superiores às da maratona. As MUM podem, assim, oferecer uma oportunidade única para investigar os limites do corpo humano a nível das respostas fisiológicas e adaptativas. Eventos competitivos como as ultramaratonas, que tanto podem ser realizadas a pé como de bicicleta, são dos exercícios mais exaustivos aos quais podemos submeter o organismo (Lombardi *et al.*, 2012; Sansoni *et al.*, 2017).

No caso das competições de ultramaratonas de bicicleta de montanha, o exercício é realizado durante um longo período, durante dias consecutivos, onde o processo é cumulativo, e além do trauma local e sistémico, os indivíduos estão submetidos às condições climatéricas e de terreno adversas; com altimetrias variadas, com um comprometimento psicológico causado pela própria competição em si e o grau de competitividade inerente ao próprio indivíduo. Estes eventos desportivos, que podem ser realizados numa variada gama de distâncias, atraem cada vez mais participantes, tornando-se populares nos últimos anos em todo o mundo, particularmente nos EUA, Europa, Japão, África do Sul e no Brasil (Millet, 2011).

1.1.3.1. DO ESTADO NUTRICIONAL À COMPOSIÇÃO CORPORAL EM PROVAS DE LONGA DURAÇÃO

O estado nutricional é uma medida da condição de estado de saúde de um indivíduo e de como é afetado principalmente pela ingestão de alimentos e utilização de nutrientes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a saúde não é apenas a ausência de doença, mas um estado completo de bem-estar mental e físico em relação à produtividade e desempenho de um indivíduo (FAO 2004).

A avaliação do estado nutricional é feita através de vários métodos: clínicos, nutricionais ou alimentares, antropométricos e bioquímicos. Não devem ser utilizados estes métodos de forma isolada, é necessário associar vários métodos para que a avaliação seja o mais precisa possível.

A avaliação clínica analisa o estado nutricional através de sinais e sintomas que se refletem nas faneras cutâneas, nas mucosas e na esclerótica e são indicativos de carências nutricionais, muitas vezes imperceptíveis numa fase inicial e, portanto, é extremamente importante a associação com outros fatores.

Na avaliação do consumo alimentar, analisam-se os hábitos alimentares, avaliando-se se há adequação ou inadequação na ingestão de nutrientes. Esta inclui vários métodos, sendo que a escolha do método depende do objetivo que se quer alcançar (Thompson, Subar, Loria, Reedy, & Baranowski, 2010). Em estudos epidemiológicos, muitas vezes o mais utilizado é o Questionário de Frequência Alimentar (QFA) (C., 2000b; Lopes, Aro, Azevedo, Ramos, & Barros, 2007) que tem como vantagens o facto de estimar a ingestão habitual do indivíduo, considerando as variações sazonais e é de baixo custo. Além de ser o mais prático, do ponto de vista estrutural, o questionário de frequência alimentar é composto por uma lista de alimentos predefinida e uma parte com a designação da frequência de consumo, alguns são semiquantitativos, definindo uma porção média de referência consumida, para que o entrevistado relate se seu consumo é superior, igual ou inferior à porção apresentada em medidas caseiras.

A avaliação bioquímica é um método que complementa os anteriores, normalmente usado para detetar deficiências nutricionais subclínicas, utilizando-se habitualmente parâmetros hematológicos como o hemograma, e bioquímicos como a transferrina, albumina, creatinina e ureia, alguns minerais e vitaminas específicas para cada caso

em que se encontrem suspeitas de alguma deficiência, e parâmetros bioquímicos urinários como a creatinina, hidroxilprolina e 3-metil-histidina (Vannucchi & Marchini, 1996).

A bioimpedância (BIA) é outro método que é muito utilizado na avaliação da composição corporal e é baseado na condução de uma corrente elétrica, de baixa intensidade, imperceptível, através de eletrodos ou de superfícies condutoras (Rossi 2001). Idealmente deve ser tetrapolar, sendo que a passagem da corrente elétrica gera uma resistência à passagem da eletricidade pelos tecidos e difere de tecido para tecido. Os valores são dados sob a forma de resistência e reactância, além do valor de “Z”, ou impedância, e posteriormente são conjugados em fórmulas para a definição da composição corporal, nomeadamente da massa muscular esquelética, da gordura corporal, da massa magra seca, da massa de tecidos moles, da massa mineral, da água corporal total, água intracelular e extracelular, ajustadas à idade, ao género, altura, peso, etnia e nível de atividade física (B. Knechtle *et al.*, 2011).

As limitações da bioimpedância estão relacionadas com as equações que levam em conta modelos físicos existentes, que consideram o corpo como um cilindro perfeito e homogéneo, além da dependência de modelos de regressão múltipla para uso em avaliações de um indivíduo. Situação que muitas vezes sobrestima a quantidade de água corporal total e que se reflete diretamente na massa magra (Lukaski *et al.*, 2013). Isto apesar de estas equações estarem cada vez mais aperfeiçoadas para a identificação mais adequada dos tecidos, podendo ser atualmente bastante bem correlacionadas com métodos como a densitometria por emissão de raios X de dupla energia (DEXA), porém bastante mais dispendioso e de mais difícil acesso para trabalhos de campo (Willems, Paulson, Keil, Brooke-Wavell, & Goosey-Tolfrey, 2015). Além disso, nos últimos estudos com a bioimpedância, autores como Lukaski identificam que a fase ângulo pode dar-nos elementos bastante importantes, que são independentes dos modelos de equações de regressão. A fase ângulo está significativamente e positivamente correlacionada com o Tecido Mole Magro (TMM), mas inversamente relacionada com a proporção de fluido extracelular para intracelular em adultos saudáveis. Mudanças precoces dos fluidos da água intracelular (AIC) para

o espaço da água extracelular (AEC) com uma relação de AEC/AIC aumentada e uma diminuição concomitante na massa celular total, ambos inclinando o ângulo de fase.

Estas alterações relacionadas com distúrbios na distribuição dos fluidos são refletidas em medidas de ângulo de fase (Lukaski *et al.*, 2017). Desta forma, a bioimpedância, apesar das limitações, poderá ser considerada um método adequado quando estamos em campo e necessitamos de avaliar a composição corporal individual.

Do ponto de vista nutricional, o exercício exaustivo de longa duração aumenta extremamente as necessidades energéticas para satisfazer todas as necessidades calóricas oriundas do exercício. Nestes eventos competitivos, que são normalmente por etapas, em vários dias consecutivos, onde muitos deles não têm intervalos definidos e outros são-no em autossuficiência, a nutrição passa a ter um peso determinante no desempenho destas atividades e no desempenho físico (Williamson, 2016).

As refeições consideradas normais, como o pequeno-almoço e jantar, são compostas por uma grande quantidade de alimentos num só momento, uma vez que estas competições se realizam durante o dia, o que por vezes pode causar alguns problemas digestivos. As demais refeições são feitas durante o evento, em movimento, e existe um consumo muito alto de suplementos como barras energéticas, géis de hidratos de carbono e géis enriquecidos com cafeína, bebidas isotónicas, bebidas hiperproteicas e hipercalóricas, com o intuito de complementar as calorias e dar respostas às necessidades fisiológicas durante a competição. Embora não tenha sido um dos objetivos avaliar o consumo deste tipo de suplementos, quase todos os atletas utilizam estes alimentos como géis e barras energéticas, como forma de complementar a nutrição, o que acarreta um aumento no consumo calórico.

Vários autores relatam os problemas gastrointestinais associados ao consumo de grandes quantidades de suplementos como géis e bebidas hipertónicas (de Oliveira & Burini, 2014; Pfeiffer, Cotterill, Grathwohl, Stellingwerff, & Jeukendrup, 2009a).

Neste tipo de atividades, a nutrição pode muitas vezes ser considerada também um fator de stress, uma vez que pode estar racionada, com temperaturas inadequadas, insuficiente ao nível calórico e ao nível nutricional. Além de estar associada a outros fatores como as condições ambientais, o esforço físico, o descanso limitado e com o

sono precário. Este tipo de competições transforma-se em eventos extremamente exaustivos que afetam o estado psicológico profundo dos competidores, elevando mais ainda o grau de complexidade destas atividades (S. Paulin, J. Roberts, M. Roberts, & I. Davis, 2015; Pfeiffer, Stellingwerff, Zaltas, & Jeukendrup, 2010).

Além do papel fundamental do ponto de vista de suprir necessidades calóricas, existem nutrientes específicos que estão muito involucrados em todos os processos metabólicos, funcionando alguns como coenzimas, outros com funções bem definidas dentro do metabolismo, como reguladores de determinadas funções. Entre eles, as vitaminas do complexo B, nomeadamente a riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6), cobalamina (B12), o ácido fólico (B9) e ácido pantoténico (B5), que estão envolvidas nos processos de regulação do metabolismo energético e na modulação da síntese e degradação dos macronutrientes (Y. N. Kim, Hwang, & Cho, 2016). A menadiona ou vitamina K atua como cofator para a enzima carboxilase, que é a responsável pelas reações de carboxilação do ácido glutâmico (Glu) e a formação do ácido γ -carboxiglutâmico (Gla), interferindo na produção de osteocalcina durante o exercício (Klack & Carvalho, 2006). O colecalciferol ou vitamina D tem um papel fundamental na reparação do tecido ósseo, na condução dos estímulos nervosos e na homeostase do músculo esquelético, e a sua deficiência pode alterar a densidade mineral óssea e interferir no metabolismo, uma vez que nas atividades de exercício exaustivo de natureza prolongada, apesar de não haver uma carga excessiva, o exercício é mantido por muito tempo com uma atividade metabólica exagerada, o que interfere em todos os padrões fisiológicos (Labronici *et al.*, 2013).

Os indivíduos normalmente estão submetidos a atividade ao ar livre, onde a incidência de luz solar é alta e provavelmente adequada para a manutenção do metabolismo da vitamina D, que necessita de sol para ser ativada (Todd *et al.*, 2016). Em relação aos minerais que mais profundamente afetam o desempenho desportivo pode assinalar-se o cálcio e o ferro, o magnésio e o zinco. Já é bastante conhecida a deficiência de ferro e o padrão das anemias ferropénicas com a diminuição do transporte de oxigénio e a melhoria na absorção de ferro em função da exposição à vitamina C e vitamina D (Dahlquist, Stellingwerff, Dieter, McKenzie, & Koehle, 2017).

O cálcio participa de vários processos bioquímicos, como a contração muscular, onde os íons de cálcio circulam através dos canais na membrana celular, integrando as proteínas actina e miosina que são responsáveis pela contração muscular (Avolio, 2008). O tecido ósseo tem uma atividade metabólica intermitente, com a formação e a reabsorção óssea contínua, que resulta na remodelação do osso, e este é mediado por uma influência hormonal da paratormona (PTH) e do calcitriol (vitamina D3).

1.1.3.2. INFLUÊNCIA SOBRE OS PROCESSOS IMUNES E INFLAMATÓRIOS

Quando os atletas são expostos ao exercício exaustivo de longa duração, como, por exemplo, nas corridas ou competições em questão, e sob a influência desses fatores agressivos (Joyner & Coyle, 2008), alterações metabólicas adaptativas são cruciais para uma melhor capacidade atlética e, portanto, melhores resultados (Nybo, 2003). Com base na literatura atual, foram identificadas algumas vias que estão ou podem estar envolvidas quando um indivíduo está exposto a esta situação. Determinados biomarcadores do stress oxidante são alterados. As lesões causadas pelo stress oxidante podem ser moduladas pela redução das espécies reativas de oxigênio (ROS), através de antioxidantes enzimáticos, nomeadamente superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do glutationo (GPx), redutase do glutationo (RGSH) e de antioxidantes não enzimáticos como a glutatona total (GS), e a relação em razão GSH/GSSG (Figura 4) (Akimoto *et al.*, 2010; Margonis *et al.*, 2007). Estas enzimas e coenzimas fazem parte do metabolismo intermediário dos glóbulos vermelhos e, em geral, o exercício regular induz alterações hematológicas também nos leucócitos (Luk, McKenzie, *et al.*, 2016). Mas imediatamente após o exercício exaustivo e prolongado, é detetada uma redução no hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e valores médios de hemoglobina corpuscular (MCH), enquanto outros parâmetros, como o volume corpuscular médio (VCM) e a hipocromia eritrocitária (HE), estão aumentados. A banda da dispersão na distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) está igualmente aumentada (Sureda *et al.*, 2005), (Lippi *et al.*, 2014). Essas alterações podem sugerir que sendo os atletas expostos a exercícios exaustivos de longa duração, a medula óssea poderá ser incapaz de compensar todas as sobrecargas induzidas por esse tipo

de exercício, o que poderia interferir com o sistema antioxidante natural em particular dos eritrócitos (C.-Y. Chen, Hsieh, Lin, Chen, & Mao, 2011).

Para manter uma resposta vascular adequada e a capacidade migratória das células sanguíneas, acredita-se que o óxido nítrico (NO), ou monóxido de azoto produzido na sequência da libertação de fatores de crescimento como a EPO (eritropoietina) e o fator de crescimento derivado da placenta (PEGF) de que apresenta um metabolismo aumentado durante o exercício agudo, será importante nesses processos (Rassaf *et al.*, 2007). De facto, o NO produzido como consequência aumenta o número de arteríolas e a densidade capilar e assim esta vasodilatação melhoraria o desempenho por melhor perfusão sanguínea (Sureda, Tauler *et al.*, 2005, Jenkins, Landers *et al.*, 2011, Lippi, Salvagno *et al.*, 2014).

Outras proteínas, incluindo proteínas de fase aguda, também têm sido implicadas no exercício exaustivo como marcadores bioquímicos de inflamação e de stress, como o fator de necrose tumoral (TNF-alfa), as interleucinas 1 beta (IL-1 β), e interleucina-6 (IL-6), haptoglobina (Hp), proteína C reativa (CRP), ferritina, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama-glutamil transferase (GGT) (Figura 4) (Gleeson, 2007, Silva e Macedo, 2011, Walsh, Gleeson *et al.*, 2011, Gunzer, Konrad *et al.*, 2012). A IL-6 já é considerada como um fator de exercício (Minetto, Rainoldi *et al.*, 2005). A capacidade de Hp se ligar à hemoglobina livre pode diminuir a indução do stress oxidante, dependente do fator genético, sendo que o fenótipo da haptoglobina (HP 1-1) está correlacionado a uma maior capacidade antioxidante (Matos *et al.*, 2014).

De facto, o exercício físico extremamente extenuante esteve recentemente associado a sérias lesões nos órgãos e sistemas, afetando a saúde em última instância (J. H. Kim & Baggish, 2017). Está bem estabelecido que a plasticidade fisiológica permite que os humanos se adaptem a exercícios físicos de intensidade regular e moderada (Impellizzeri & Marcora, 2007), apesar de novas explicações hipotéticas sobre mecanismos de adaptação ao exercício extremo serem difundidas. Apenas alguns estudos, num pequeno número de atletas, focam os efeitos de uma ultramaratona no sangue e nos marcadores inflamatórios (Chiu *et al.*, 2015; Lippi *et al.*, 2014; Paulsen, Mikkelsen, Raastad, & Peake, 2012; Robach *et al.*, 2014). Os esforços de resistência repetidos, extenuantes e de longa duração no contexto de uma

competição de ultramaratona de ciclismo de nove dias não foram fisiologicamente caracterizados.

O exercício extenuante é conhecido por induzir hemólise intravascular, diminuindo assim a massa de glóbulos vermelhos, apesar da regulação positiva da eritropoiese associada ao exercício (Figura 3) (Mairböurl, 2013). A hemólise induzida pelo exercício foi descrita em glóbulos vermelhos senescentes devido à diminuição da deformabilidade e maior suscetibilidade ao stress mecânico (Robach *et al.*, 2014). A Hp (haptoglobina), um marcador inflamatório de fase aguda, aumenta em muitas situações associadas à inflamação, tal como a existente em exercícios extremos altamente exigentes em que se liga à hemoglobina livre derivada de hemólise associada ao exercício.

Após a ligação do complexo de hemoglobina-Hp com o recetor solúvel de Hp (CD163), ele desempenha um papel crítico na prevenção de efeitos tóxicos induzidos por hemoglobina, disfunção vascular e lesão orgânica. Este complexo desencadeia uma cascata celular após a ligação por endocitose, funcionando como imunomodulador (Landis, Philippidis, Domin, Boyle, & Haskard, 2013). A haptoglobina é principalmente sintetizada em hepatócitos e leucócitos, embora também seja produzida por adipócitos e tecido cerebral em resposta à secreção de citocinas interleucinas 6 e 1 (IL-6 e IL-1) (C.-Y. Chen *et al.*, 2011). A haptoglobina não é reciclada e os seus níveis plasmáticos recuperam-se somente após cinco a sete dias, aumentando com a idade (Alayash, 2011).

Os fatores genéticos podem explicar os níveis circulantes de Hp e podem determinar a gravidade da resposta inflamatória ao exercício extremo. O gene *HP* possui uma variante comum do número de cópias de 1,7 kb que confere um domínio e determina o fenótipo bioquímico da proteína Hp (Boettger *et al.*, 2016). O fenótipo pode apresentar-se como um dímero (alelo homozigótico *HP1*) ou multímetro (*HP2* homozigoto) (Langlois & Delanghe, 1996). O alelo homozigoto *HP1* está associado a maiores níveis em circulação da Hp e a uma resposta antioxidante mais eficiente (Goldenstein, Levy, & Levy, 2012). Além disso, a heme oxigenase 1 (HMOX1) é responsável pela degradação de heme em monóxido de carbono e biliverdina e ferro ferroso livre (Taha *et al.*, 2010). O ferro é libertado pela ação de HMOX1, armazenado

como ferritina ou exportado pela ferroportina (FP) e ceruloplasmina (CPL) e em seguida é transportado pela transferrina para a medula óssea para reutilização na síntese de hemoglobina (Taha *et al.*, 2010). Um polimorfismo genético funcional de *HMOX1* no locus -413T/A tem sido relacionado a maior atividade (Ono *et al.*, 2004).

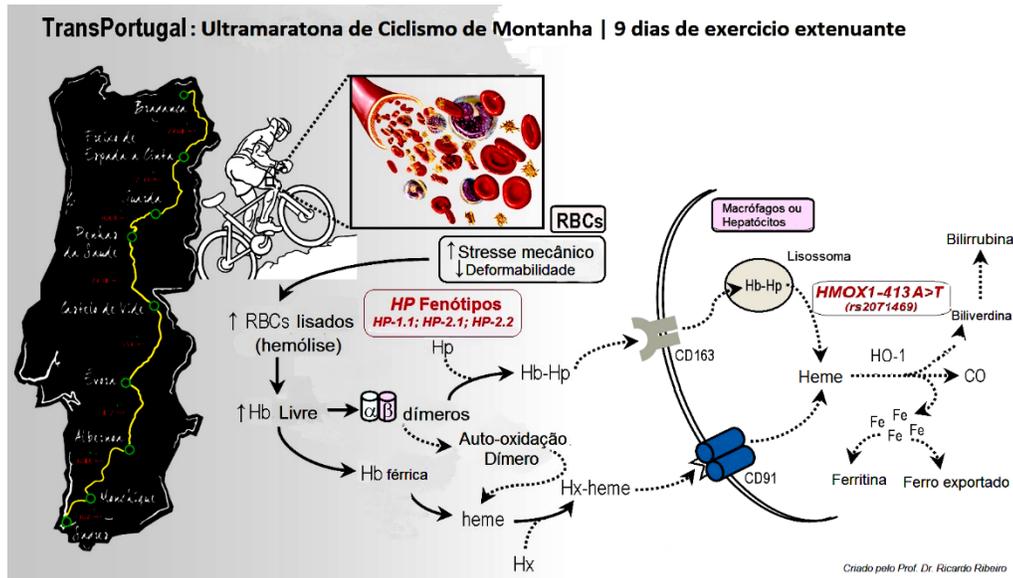


Figura 3: Modelo hipotético para o impacto da ultramaratona de ciclismo de montanha TransPortugal nos processos imunes e inflamatórios. Os efeitos cumulativos extenuantes de uma ultramaratona poderão ter impacto na resposta imune e metabólica, sendo que algumas variantes genéticas nas vias referidas poderão contribuir para explicar a variabilidade interindividual observada neste tipo de provas. Hb, hemoglobina; RBCs, glóbulos vermelhos; Hp, Haptoglobina; CD163, recetor solúvel da haptoglobina, HO-1, heme-oxigenase 1; Hx, hemopexina; Fe, ferro; CO, monóxido de carbono.

1.1.3.3. EIXO ENDÓCRINO DA INTERAÇÃO OSSO-MÚSCULO

Do ponto de vista metabólico, uma conduta de exercício moderada e regular traz vantagens com melhoria na sensibilidade à insulina e um aprimoramento do perfil lipídico (Caro *et al.*, 2013). Além disso, tem havido muito interesse pela irisina como possível fator do exercício que melhora o desempenho dos atletas, uma vez que tem sido associada com o escurecimento dos adipócitos brancos (o que aumenta o gasto energético) e um possível papel regulador para o controlo simpático (Bostrom *et al.*, 2012; Scalzo *et al.*, 2014).

Estes sistemas afetados estão interrelacionados, e dentro de um exercício exaustivo de longa duração há algum tipo de equilíbrio. De facto, o sistema de stress, incluindo a função imunológica, é também regulado pelo HPA (eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal). No exercício agudo, a libertação aumentada de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-alfa, IL-1) estimula o HPA e o sistema de hormonas libertadas da corticotrofina (CRH), levando indiretamente, através da secreção de glucocorticoides, à reação inflamatória (Fuqua & Rogol, 2013; Gleeson, 2007; Mastorakos, Pavlatou, Diamanti-Kandarakis, & Chrousos, 2005). Na verdade, isso dá-nos uma ideia de uma interação recíproca entre o cérebro e o sistema imunológico.

O exercício físico pressupõe o uso dos mecanismos homeostáticos moleculares e fisiológicos humanos mais refinados para se adaptarem, particularmente no contexto de esforços extremos. Frequentemente, esses exercícios altamente exigentes estão associados à produção de miocinas através da contração de músculos esqueléticos, resposta imuno-inflamatória alterada e efeitos metabólicos e estruturais, aumentando a sensibilidade à insulina em reação à resposta humoral às variações de glicose em circulação, tanto no exercício exaustivo agudo quanto a longo prazo. O exercício físico de longo prazo, repetitivo e extenuante, que desafia os limites da capacidade humana para se adaptar fisiologicamente, tem sido pouco estudado, particularmente o envolvimento do eixo mecanizado integrado em órgãos distintos, mas que interagem entre si, representando um modelo final de análise dos limites de desempenho humano (Jørgen Jensen, Rustad, Kolnes, & Lai, 2011; B. K. Pedersen & Febbraio, 2012).

A qualidade do exercício (tipo, intensidade e duração) e, mais importante, a magnitude da carga explicam os efeitos locais e endócrinos do exercício (Lombardi, Sanchis-Gomar, Perego, Sansoni, & Banfi, 2016).

Enquanto alguns autores mencionaram que o stress repetitivo durante longos períodos de treino pode não ser suficiente para aumentar a densidade mineral óssea (DMO) (Cadore, Brentano, & Krueel, 2005; Guillaume, Chappard, & Audran, 2012; Zanatta, Boguszewski, Borba, & Kulak, 2014), outros sugerem que a intensidade da carga é mais importante do que a duração, modulando assim o metabolismo ósseo (Andreoli *et al.*, 2001).

A densidade óssea é influenciada pelo stress ou impacto ósseo. O stress aplicado ao segmento esquelético afeta a geometria do osso, a microarquitetura e a composição da matriz. De acordo com isso, os ciclistas têm menor densidade de massa óssea do que os corredores, devido à carga grande e repetitiva nos membros inferiores que a corrida confere, provavelmente estimulando o anabolismo e a renovação óssea (Warner, Shaw, & Dalsky, 2002).

O músculo esquelético, como órgão metabolicamente ativo, liberta várias miocinas, a citocina interleucina (IL) -6 é a mais bem estudada, com os níveis circulantes aumentados em mais de 100 vezes com o exercício intenso e prolongado (Fischer, 2006; Ostrowski, Schjerling, & Pedersen, 2000). Além disso, durante este exercício, a contração muscular também induz aumento de glicose circulante, sensibilidade à insulina e outras exigências metabólicas (Brotto & Johnson, 2014; Cianferotti & Brandi, 2014).

A osteocalcina (Oc), mais do que uma proteína da matriz óssea (J. Chen *et al.*, 2016; Mera *et al.*, 2016), tem sido associada à regulação do metabolismo da glicose e outros aspectos do metabolismo energético, por exemplo, o que é observado em atividades físicas altamente exigentes, como a resistência ou exercícios de longo prazo. Mera & colaboradores descreveram um mecanismo para o qual a secreção induzida da osteocalcina pelo exercício aumenta a absorção e utilização de combustível energético do músculo esquelético, mediando a libertação de IL-6 derivada do músculo, que, por sua vez, alimenta positivamente de volta, atuando sobre o osso para amplificar a secreção de osteocalcina novamente durante o exercício (Comassi *et al.*, 2015; Mera *et al.*, 2016).

Embora a atividade física possa influenciar positivamente o processo biomecânico e a remodelação óssea, a responsabilidade por esse efeito não é clara, e muitos outros fatores podem mediá-los, como a nutrição, a homeostase hormonal e a influência genética. Estudos que exploram o ADR2 (receptores beta adrenérgicos) ressaltaram a importância dos efeitos deste gene no desempenho da resistência devido à sua expressão ao longo dos sistemas cardiovascular, respiratório, metabólico e

musculoesquelético, juntamente com sua influência no metabolismo lipídico, regulando o gasto energético do tecido adiposo (Sarpeshkar & Bentley, 2010).

1.1.3.4. FATORES NEUROTRÓFICOS: MODULAÇÃO NEURONAL

Efeitos sobre fatores neurotróficos também foram sugeridos como estando envolvidos no exercício, levando, por exemplo, ao aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Skriver *et al.*, 2014; Szuhany, Bugatti, & Otto, 2015). O BDNF é uma neurotrofina essencial que também está intimamente ligada aos processos moleculares centrais e periféricos do metabolismo energético, da homeostasia e do aumento das hormonas glicocorticóides (Knaepen, Goekint, Heyman, & Meeusen, 2010).

Também foi sugerido que essas citocinas pró-inflamatórias podem ser a causa comum da depleção dos níveis de 5-HT após o exercício agudo e, portanto, a depressão associada (Meeusen, Watson, Hasegawa, Roelands, & Piacentini, 2007; Noakes, 2012). Os níveis de glicocorticóides e 5-HT são regulados por esses aspetos imunológicos e a ativação da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) por citocinas pró-inflamatórias aumenta o consumo de 5-HT, influenciando a capacidade adaptativa dos atletas em resposta a fatores de stress (Maes, Leonard, Myint, Kubera, & Verkerk, 2011; Mastorakos *et al.*, 2005; Muller & Schwarz, 2007).

Note-se que as variações polimórficas na sequência das variantes do transportador de serotonina (*5HTVNTR* e *5HTTLPR*) e do seu recetor (*5HT2A*) e da monoamina oxidase A (MAO-A) refletem diferenças na biodisponibilidade de 5HT. Como tal, os atletas com um genótipo ss "*curto*" de polimorfismo *5HTTLPR* são mais suscetíveis aos fenómenos de exaustão (Trushkin *et al.*, 2011).

Por outro lado, quando os atletas são expostos ao exercício exaustivo, isso pode ter menos benefícios do que o exercício físico *per se*, pois pode induzir grandes alterações metabólicas, como níveis mais elevados de cortisol, aumento do stress oxidativo, supressão do gatilho das funções do sistema imunológico. Além disso, também pode ter efeitos no sistema nervoso central (SNC), nomeadamente no eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HPA) e no sistema simpático autónomo (Silva & Macedo, 2011;

Taylor *et al.*, 2000). No caso do BDNF, como consequência do stress presente no exercício exaustivo, este tem sido relacionado com a disfunção da plasticidade neuronal, neurogênese ou remodelação (Rojas Vega *et al.*, 2006).

Como o processo inflamatório é necessário e visa restabelecer a homeostasia do organismo, através da remodelação e da reparação dos tecidos, posterior às lesões tecidulares, ocorrem ativações dos leucócitos, das citocinas e das proteínas de fase aguda, entre elas a haptoglobina, assim como das hormonas, e outras moléculas sinalizadoras (Silva & Macedo, 2011). A resposta ao exercício extremo induz um estado pró-inflamatório que apresenta leucocitose e neutrofilia, monocitose e linfocitose com diminuição da imunidade celular (Gleeson, 2007) e cursa adicionalmente com o aumento da proteína cinase e da proteína C reativa, secreção aumentada de cortisol e de citocinas, sendo proporcional ao esforço (Bird, Linden, & Hawley, 2013). O treino adequado causaria a adaptação do organismo ao exercício e um efeito protetor e anti-inflamatório, devendo ser progressivo em função de variáveis como carga, duração, descanso, frequência, repetições e amplitude dos movimentos.

Estes exercícios têm como consequências microtraumas com aumento dos neutrófilos, macrófagos e outros elementos causando a inflamação (Silva & Macedo, 2011). Logo, o organismo passa por uma adaptação face à inflamação que é compreendida por três fases: a fase degenerativa, onde o sarcolema liberta prostaglandinas, leucotrienos e eicosanóides que sinalizam o local da lesão; segue-se a fase de regeneração, onde os neutrófilos provenientes da medula óssea mediados por citocinas como a IL-6 fagocitam os detritos produzidos pelas lesões tecidulares; e por último vem a fase de remodelação, em que ocorre a reparação e permite a reorganização do tecido e o crescimento de novas células (Silva & Macedo, 2011). Sob a exigência do exercício exaustivo de longa duração, a resposta inflamatória adequada fica comprometida uma vez que o processo inflamatório é exacerbado, e existe uma ineficiência da medula em produzir leucócitos suficientes e as suas subpopulações para dar seguimento ao processo de remodelação celular (B. K. Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). O processo acontece, mas de uma forma bastante mais inadequada ou com uma resposta mais ineficiente.

Como desafios adicionais a todo o processo, encontramos os fatores de stress ambiental, em que se incluem o frio e o calor para além da humidade, que afetam a produção de leucócitos e afetam a resposta inflamatória e consequentemente a homeostase fisiológica (Luk, Levitt, *et al.*, 2016). Em baixas temperaturas as concentrações séricas de IL-6 e cortisol estão aumentadas, sendo de salientar que a maioria das competições de ultramaratonas de ciclismo de montanha são realizadas normalmente nas épocas de primavera, onde a temperatura média é bastante amena, contudo apresenta-se uma amplitude térmica elevada nestes períodos, o que poderá afetar o desempenho dos atletas (Kraemer *et al.*, 2008).

1.1.3.5. A VARIAÇÃO INTERINDIVIDUAL

Embora alguns estudos tentem identificar um ponto homeostático, não há evidência suficiente para especificar os mecanismos genéticos subjacentes à herdabilidade dos traços de atividade física que aprofundam a transição de um exercício regular ou crónico para um exercício exaustivo de longa duração (Eynon *et al.*, 2011; Sawczuk, Maciejewska, Ciężczyk, & Eider, 2011).

É reconhecido que as adaptações fisiológicas são moduladas por outros fatores constitucionais em que se incluem as variabilidades genética e a epigenética explicada pelos polimorfismos é pequena (~ 5%) (Mori *et al.*, 2009). Os efeitos combinados e de interação dos polimorfismos funcionais destes fatores com vários biomarcadores discutidos poderiam explicar a interindividualidade associada ao exercício exaustivo de longa duração (Ebrahim & Davey Smith, 2008). Este potencial do atleta dependente do perfil genético pode melhorar a função cardiovascular (Campos, Gomes, & Ferreira, 2013). Um dos primeiros genes associados ao exercício, sendo ainda o mais estudado, foi o do enzima conversor de angiotensina (ECA) (Wang, Liu, & Qiao, 2012) e o seu genótipo II de ECA 1 (I/D) parece estar mais representado em atletas de desportos de resistência (Ma *et al.*, 2013).

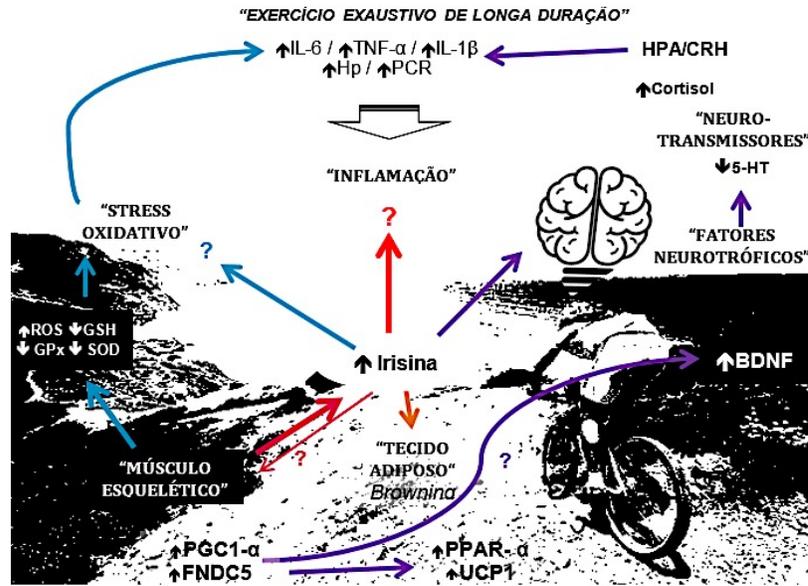


Figura 4: Modelo hipotético para o impacto da ultramaratona de ciclismo de montanha TransPortugal na resposta endócrina, metabólica e inflamatória no exercício exaustivo de longa duração. Esta figura descreve as interações complexas entre os sistemas metabólico, antioxidante, imune, neurotrófico e dos neurotransmissores em atletas expostos a exercício exaustivo de longa duração. Apesar de um mecanismo de adaptação no exercício regular, este benefício pode não ser observado num exercício desta natureza. Diversos biomarcadores têm sido tentativamente associados a uma melhor performance neste tipo de exercício, como irisina, BDNF, PGC1 α , entre outros. No entanto, os resultados não são de todo claros ou concordantes. Legenda: IL-6, interleucina 6; TNF- α , factor de necrose tumoral; IL-1 β , interleucina 1 beta; Hp, Haptoglobina; PCR, proteína C-reativa; HPA, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e sistema de hormonas libertadoras de corticotrofina; 5-HT, serotonina; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; UCP-1, proteína de desacoplamento 1; PPAR- α , recetor ativado por proliferadores dos peroxissomas gama 1 α ; PGC1- α , recetor activado por proliferador de peroxissoma Gama coactivador 1 α (PGC) -1 α ; FNDC5, domínio de fibronectina tipo III; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPx, glutatioxoperoxidase; GSH, glutatioxoxidada; RGS, glutatioxoxidada; RGS, glutatioxoxidada.

CAPÍTULO II

– Hipótese & Objetivos –

2 HIPÓTESE & OBJETIVOS

O exercício físico extremo e de longa duração afeta de tal maneira a resposta endócrina, metabólica e inflamatória que poderá ser prejudicial à saúde. Desta forma, propôs-se avaliar o impacto da ultramaratona TransPortugal, de carácter extenuante e de longa duração, na resposta endócrina, metabólica e inflamatória de atletas amadores. De acordo com esta resposta, pretendeu-se identificar um perfil genético que contribua para o excelente desempenho de alguns atletas – variabilidade interindividual –, tendo como objetivo contribuir para uma adequação dos treinos com uma melhor monitorização ou planeamento dos mesmos, diminuindo os efeitos negativos do exercício prolongado de longa duração.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- avaliar se o perfil nutricional e de composição corporal pode estar correlacionado com o desempenho dos atletas;
- avaliar o impacto deste exercício na resposta inflamatória e do catabolismo da hemoglobina;
- analisar a interação do músculo-osso tendo em conta o comportamento de biomarcadores metabólicos desta via;
- analisar a influência sistémica do impacto deste tipo de exercício, desde o músculo ao sistema nervoso central, pela análise de biomarcadores associados com a neuroplasticidade e capacidade cognitiva;
- analisar variantes genéticas relacionadas com as vias identificadas nas alíneas anteriores e associadas ao desempenho que possam servir de linhas orientadoras aos atletas que compitam especificamente em provas extenuantes de longa duração.

CAPÍTULO III

– Materiais & Métodos –

3 MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. ARQUITETURA DA PROVA – CONCEÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo analítico, observacional e transversal envolveu 55 atletas amadores e aparentemente saudáveis que participaram na prova de ciclismo de montanha em Portugal decorrida em 2013 (11.^a Edição da TransPortugal).

A influência deste tipo de exercício na resposta endócrina, metabólica e inflamatória foi avaliada antes e imediatamente após a prova (T0 e T9, respetivamente), tendo em conta as seguintes vertentes: características antropométricas, composição corporal, biomarcadores sanguíneos e salivares, e perfil genético (Figura 5). Esta prova, de autossuficiência (orientada por GPS), é disputada por todos os concorrentes em simultâneo que competem entre si com o objetivo de realizarem a sua prova gastando o menor tempo possível. O resultado final depende do tempo total acumulado, sendo o atleta vencedor o que apresente menor tempo total acumulado, ajustado para eventuais penalizações e bonificações. Para ajustar as capacidades de todos os concorrentes da prova, independentemente do sexo ou idade, a organização instituiu um sistema de bonificações que se reflete na hora oficial da partida.

3.1.1. CONDIÇÕES DO TERRENO

A TransPortugal é uma corrida de ciclismo de montanha com um percurso de 1150km através de trilhos de floresta, estradas de cascalho, calçadas romanas, trilhos íngremes e estreitos, penhascos e estradas de terra que atravessam Portugal, de norte a sul em nove dias (de Bragança a Sagres) (Figura 5).

A prova referida está formalmente inscrita na Federação Portuguesa de Ciclismo e caracteriza-se por um elevado nível de exigência técnica e por condições adversas de terreno, realizada através de percursos diários consecutivos (o mais curto de 95 km e o mais longo de 162 km), com um total de 24 500 m de escalada vertical (Figura 5).

Relativamente às condições atmosféricas, foram obtidos dados de temperatura e humidade para cada uma das nove etapas da TransPortugal, a partir dos registos do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPAM).

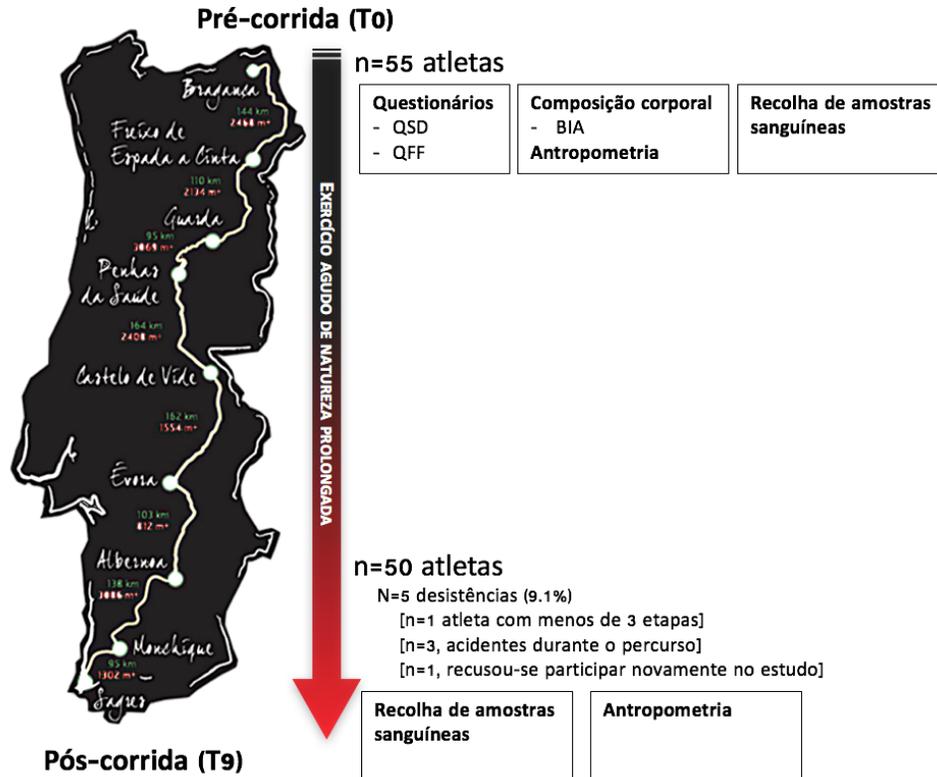


Figura 5: Conceção do estudo: as avaliações foram realizadas antes (T0) e imediatamente após a prova (T9). Para cada atleta e no momento T0, foram aplicados os questionários (QSD e QFA), colhidas amostras biológicas (sangue e saliva) e realizada a avaliação antropométrica e da composição corporal. No momento T9, foi repetida a avaliação das amostras biológicas e da composição antropométrica (peso).

QSD: Questionário sociodemográfico; QFA: Questionário de frequência alimentar.

3.2. ESTRUTURA DOS ATLETAS

3.2.1. PARTICIPANTES

Os participantes inscritos na TransPortugal foram contactados por e-mail antes da prova para participação no projeto. Esta prova tem um limite máximo de 80 inscrições. Dos 76 atletas inscritos que iniciaram a prova, 55 integraram o estudo, contribuindo com a doação de amostras biológicas, caracterização antropométrica, composição corporal e preenchimento de questionários, e, dadas as características específicas e exigentes desta prova, os participantes foram considerados elegíveis caso apresentassem condições físicas para realizar a prova e estivessem dispostos a assinar o consentimento informado.

Os atletas recrutados para o projeto, com idade média de $44,8 \pm 7,1$ anos de idade (de 27 a 56 anos), eram majoritariamente caucasianos (92,7%), provenientes de 20 nacionalidades.

O sangue foi colhido através de punção venosa no sangradouro do antebraço e processado imediatamente antes do início da corrida (T0) e imediatamente após o último percurso (T9), entre 5-15 minutos, logo após a conclusão da corrida.

3.2.2. SISTEMA DE *HANDICAPS*

Para ajustar as capacidades de todos os concorrentes em prova independentemente do género e da idade, introduziu-se um esquema de bonificações que estabelece percentagens de tempo a calcular relativamente ao tempo nominal indicado pela organização para cada etapa. Destes cálculos obtêm-se valores de tempo que serão subtraídos à hora oficial de partida. Ou seja, os atletas sairão antes da largada oficial e partem em função do género, com uma redução de 14% do tempo para as mulheres e para cada atleta com mais de 40 anos. Independente do género, será calculado um valor para cada intervalo de idade, no caso de uma atleta feminina com mais de 41 anos, esta terá dupla bonificação: 14% por ser do sexo feminino e 2% por ter 41 anos, somando então 16% de bonificação, que deverão ser deduzidos ao tempo oficial da largada. As percentagens obedecem os seguintes critérios: de 41 a 45 anos: 2%; de 46 a 50 anos: 5%; de 51 a 55 anos: 9%; de 56 a 60 anos: 14%; de 61 a 65 anos: 19%; de 66 a 69 anos: 24%; mais de 70 anos: 30%.

3.2.3. GERAIS, CLÍNICOS E FISIOLÓGICOS

Foi desenvolvido um questionário sociodemográfico (QSD) geral para obter dados referentes a aspetos demográficos, sociodemográficos, culturais, história familiar, suplementação nutricional.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas no braço esquerdo após 10 minutos de descanso e com o participante na posição sentada. Antes da prova, foi medida a pressão arterial utilizando um esfigmomanómetro automatizado (Omron®),

modelo M6 Comfort, HEM-7000/E, Schaumburg, USA). O resultado médio de duas medições foi avaliado.

3.2.4. ANTROPOMETRIA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Os dados antropométricos obtidos foram o peso, a altura e o perímetro abdominal, tendo sido medidos de acordo com procedimentos padronizados e diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) ((WHO), 1995; Lohmann, Roche, & Martorell, 1988) . A altura foi registada utilizando um estadiómetro portátil SECA[®] (modelo 213, Hamburgo, Alemanha). O peso foi medido em quilogramas com uma precisão de 100g, utilizando uma balança SECA[®] (Robusta, modelo 813, Hamburgo, Alemanha). O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado utilizando a fórmula [peso (kg) / altura (m²)]. A avaliação das circunferências da cintura e da anca foi realizada.

As estimativas da composição corporal (% massa gorda (%MG) e % massa livre de gordura (%MLG)) foram determinadas através de análise de impedância bioelétrica (BIA), utilizando um sistema bioelétrico tetrapolar portátil (Quantum X, RJL Systems Inc., Michigan, EUA). Por questões metodológicas envolvidas com as medições elétricas, a BIA foi realizada apenas antes do início da corrida e seguidas as orientações do fabricante (Systems, 2015).

Foram removidos os sapatos e meias (geralmente o estudo é concluído no lado direito do corpo). O atleta deve estar deitado com os braços num ângulo de 30 graus e as pernas não devem tocar entre si. Devem ser removidas todas as joias ou todos os adereços metálicos.

Os locais de colocação dos eléctrodos devem ser limpos com álcool, especialmente se a pele estiver seca ou coberta com loção, com o objetivo de remover qualquer resíduo de gordura para uma adequada aderência dos eléctrodos.

Estes devem ser posicionados nas mãos, numa linha imaginária na parte proximal da ulna e na falange proximal do dedo médio; nos pés devem ser colocados numa linha imaginária na altura do maléolo médio e na base do segundo dedo.

O indivíduo não deve ter realizado nenhum tipo de exercício ou uma sauna dentro das 8 horas prévias ao teste e deve abster-se da ingestão de álcool nas 12 horas prévias ao mesmo.

A altura e o peso do sujeito devem ser medidos e registrados com precisão.

O indivíduo não deve estar com a pele húmida ou apresentar febre.

A percentagem de massa gorda ou gordura corpora (%GC) foi também estimada utilizando equações antropométricas, nomeadamente, Deurenberg (%GC = $1,29 (\text{IMC}) + 0,20 (\text{I}) - (11,4 \times \text{gênero}^*) - 8$) e Gallagher (%GC = $0,146 (\text{IMC}) + 0,14 (\text{I}) - (11,6 \times \text{gênero}^*) - 10$), (Deurenberg, Yap, & van Staveren, 1998; Gallagher *et al.*, 1996) e compararam-se estes resultados com os valores do método BIA, utilizando a análise de Bland-Altman (Bland & Altman, 1986).

3.2.5. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

A ingestão de energia foi estimada a partir de um questionário de frequência alimentar (QFA) (C., 2000a; Lopes *et al.*, 2007). Os dados foram, posteriormente, analisados com o software *Food Processor Plus*® (ESHA Research, Salem, USA). Os valores de ingestão obtidos para vitaminas e minerais foram comparados com os valores das doses diárias recomendadas (DRI) publicadas pelo *Institute of Medicine* (Medicine, 2003). A prevalência da inadequação de ingestão de macro e micronutrientes foram também calculadas.

3.2.6. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

O sangue foi colhido através de punção venosa no sangradouro do antebraço e processado antes do início da corrida e imediatamente após o final da 9.^a etapa (entre 5 a 15 minutos após o completar do percurso final). O sangue venoso foi colhido em tubos secos e com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Vacuntainer tubes, Sarstedt, Portugal), tendo sido mantidos a 4°C até processamento. Um tubo com EDTA foi conservado a 4°C e enviado para o Laboratório Joaquim Chaves (até 12h após colheita) para determinação de: contagem de células hematológicas por citometria de fluxo (ADVIA 120); proteína C reativa por turbidimetria; o colesterol total, as frações

HDL e LDL, triglicéridos, ácido úrico, ferritina, transaminases hepáticas – AST, ALT e GGT – determinados pelo método padronizado da Federação Internacional de Química Clínica modificado (ADVIA 1200); glicose pelo método da hexoquinase (ADVIA 1200); bilirrubina total, direta e indireta pelo método metavanadato de Na⁺ (ADVIA 1200); creatinina pelo método de Jaffe modificado (ADVIA 1200); haptoglobina sérica por nefelometria (BN ProSpec); insulina por quimioluminescência (ADVIA Centaur); testosterona por HPLC.

A outra parte das amostras colhidas foram imediatamente processadas no local da colheita para obtenção de plasma e soro para posterior determinação de biomarcadores. Dos biomarcadores selecionados, a irisina foi determinada no soro, cujo sangue foi centrifugado a 1600xg durante 15 minutos a 4°C com aprotinina (0,5 UTI/mL de sangue). O sangue colhido em EDTA foi centrifugado a 1000xrpm durante 10 minutos a 4°C. O plasma foi retirado para posterior centrifugação a 4000xrpm durante 10 minutos para extração de plaquetas.

A saliva foi colhida usando um tubo de colheita (salivette, Sarstedt, Portugal) no mesmo momento da colheita de sangue, tendo sido garantidas as condições adequadas da sua colheita de acordo com o fabricante.

O soro, plasma e saliva foram conservados a -20°C e -80°C.

Nestas amostras foram determinados por ensaios imunoenzimáticos de sanduíche quantitativo (ELISAs) e em duplicado os seguintes biomarcadores endócrinos, metabólicos e inflamatórios: interleucina 6 (IL-6) (HS600B, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (HSTA00D, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), recetor solúvel da haptoglobina (sCD163) (DC1630, R&D Systems, Abingdon, RU), serotonina (IBL, RE59121, Hamburgo, Alemanha), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, IBL, Hamburgo, Alemanha), osteocalcina (OC) (DSTCN0, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), irisina (EK-067-29, Phoenix Pharmaceutical, Inc., Karlsruhe, Alemanha) e cortisol (KGE008B, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Para estas determinações foram seguidos os protocolos sugeridos pelos fornecedores sem necessidade de otimização. Brevemente, um anticorpo monoclonal específico para proteína humana analisada foi pré-revestido sobre uma microplaca. Padrões e amostras são pipetados para os poços e qualquer

proteína de interesse presente é ligada pelo anticorpo imobilizado. Após lavagem de quaisquer substâncias não ligadas, é adicionado aos poços um anticorpo policlonal ligado à enzima específica para proteína de interesse. Após uma lavagem para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, adiciona-se uma solução de substrato aos poços. Após um período de incubação, a cor desenvolve-se proporcionalmente à quantidade de proteína de interesse ligada no passo inicial. Neste passo, e para o TNF- α e IL-6, adicionou-se uma solução amplificadora aos poços. A intensidade da cor é medida de acordo com a absorvência sugerida pelo fornecedor. Utilizou-se o leitor de placa por espectrofotômetro de absorvência de 96 poços da Bio-Rad PR2100.

3.2.7. SELEÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS

Foi selecionada uma variante para cada um dos seguintes genes: *HP*, *HMOX1*, *ADR β 2*, *LEP*, *BGLAP* (Tabela 1). Para tal foram selecionados os polimorfismos funcionais, a maioria de um único nucleótido (SNPs) com menor frequência alélica superior do que 10% na população caucasiana que tenha sido referida na literatura por estar envolvida em temas de variabilidade interindividual com o exercício físico ou especificamente com o exercício extenuante de longa duração ou por ter envolvimento funcional de acordo com uma base pública (dbSNP – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) e com as referências mais recentes. A lógica do estudo de polimorfismos funcionais é que se, por um lado, nos informa da variabilidade interindividual; por outro, são biomarcadores substitutos “subrogate” de biomarcadores bioquímicos e outros mais distantes relacionados com desfechos ou “end-points” relevantes. As características de cada polimorfismo e o seu papel funcional estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Variantes genéticas relevantes no exercício extenuante e o seu papel funcional.

	Gene	Polimorfismo	Papel funcional
Heme-oxigenase 1	<i>HMOX1</i>	-413 T/A (rs2071469)	AA \uparrow Atividade
Recetor β 2 adrenérgico	<i>ADRβ2</i>	Gli16Arg (rs1042713)	AA \uparrow expressão
Leptina	<i>LEP</i>	-2548 G/A (rs2167270)	AA \uparrow Níveis séricos
Osteocalcina	<i>BGLAP</i>	-298 T/C (rs1800247)	TT \uparrow expressão da
Haptoglobina	<i>HP</i>	Fenótipos: <i>HP</i> -1,1, <i>HP</i> -2,1, <i>HP</i> -2.2	1,1 \uparrow níveis circulantes

3.2.7.1. DETERMINAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS

3.2.7.1.1. DETERMINAÇÃO DOS SNP

O ADN genómico foi isolado através de um método não enzimático adaptado a partir de um método anteriormente descrito (Lahiri & Nurnberger, 1991). A quantidade e a integridade do DNA foram avaliadas usando *Nanodrop* e eletroforese em gel. O SNP no gene *HMOX1*, uma substituição A > T localizada na posição -413 na região promotora (rs2071746), foi determinado por reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex de dois tubos. Em resumo, a região de interesse foi amplificada, utilizando PCR de alelos específicos numa reação de 25 µL: 10 mM de cada iniciador (Direto A: 5'FAM-TGATGTTGCCACCAGGCTA-3', T: 5'FAM-TGATGTTGCCACCAGGCTT-3' e Reverso: 5'GGAGCAGTCATATGACCCTTGGG-3'); 100 ng de ADN genómico, nucleótidos 0,2 mM, DreamTaq Green com dNTP 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM e Taq polimerase 1 U (Thermo Scientific). As condições de PCR foram sujeitas a um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguido de 28 ciclos de amplificação (94°C durante 30 segundos, 61°C durante 30 segundos, 72°C durante 40 segundos) e a um passo de extensão final de 72°C durante 10 minutos. O fragmento resultante era uma banda de 290 pb, resolvido por eletroforese num gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio (10 µg/mL) durante 60 minutos a 80 volts.

O SNP no gene *ADRβ2*, uma substituição de glicina por arginina na posição 16 (rs1042713), foi determinado por PCR e por restrição do fragmento (RFLP). Resumindo, a região de interesse foi amplificada numa reação de 25 µ, ou seja, 10 mM de cada iniciador (Direto: 5CCTTCTTGCTGGCACCCCA3; Reverso: 5'GGAAGTCCAAAACCTCGCACCA3); 100 ng de ADN genómico, nucleótidos 0,2 mM, DreamTaq Green com dNTP 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM e Taq polimerase 1 U (Thermo Scientific). As condições de PCR foram sujeitas um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C durante 30 segundos, 63,6°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos) e a um passo de extensão final de 72°C durante 10 minutos. O fragmento resultante de 308pb foi incubado a 37°C/5 minutos e 65°C/19 minutos com NcoI e, posteriormente, visualizado

por eletroforese num gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio (10 µg/mL) durante 60 minutos a 80 volts, resultando as seguintes bandas: homozigóticos A – 308pb; heterozigóticos – 308pb, 291pb, 17pb; homozigóticos G – 291pb, 17pb.

A determinação do polimorfismo da *LEP* foi realizada por amplificação por PCR usando os seguintes *iniciadores*: direto 5'-TTTCCTGTAATTTTCCCGTGAG-3', reverso 5'-AAAGCAAAGACAGGCATAAA-3'. O fragmento de DNA de 242 pb resultante foi incubado a 37°C/24 horas com Hin6I, um isosquizómero de CfoI. Após a restrição, as bandas foram visualizadas num gel de agarose de 2% corados com 0,5% de brometo de etileno e fotografados sob iluminação UV. O polimorfismo foi definido pela presença (G) ou ausência (A).

O polimorfismo na região do promotor do gene osteocalcina (*BGLAP*), uma substituição de T>C na posição -298 na região promotora (rs1800247), foi determinado por PCR/RFLP. A presença dos polimorfismos foi detetada pela amplificação do DNA genómico com os seguintes iniciadores de oligonucleotídicos: direto, 5'-CCGCAGCTCCCAACCACAATAAGCT-3'; reverso, 5'-CAA-TAGGGCGAGGAGT-3'. A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 µl, constituído por 2 µl de ADN genómico, 1 µl de cada iniciador, 12,5 µl de DreamTaq Green e 8,5 µl de água destilada. O protocolo de amplificação compreendeu a desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos; e uma extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Os procedimentos de controle de qualidade para a genotipagem incluíram a dupla amostragem de 10% das amostras para avaliar a confiabilidade e o uso de controles negativos para falsos positivos. Dois autores obtiveram os resultados independentemente, e os resultados ambíguos foram reanalisados.

3.2.7.1.2. DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA HAPTOGLOBINA

O polimorfismo da *HP* (*HP-1.1*, *HP-2.1* e *HP-2.2*) foi determinado no plasma usando eletroforese em gel de poliacrilamida e a sua presença foi detetada pela atividade de

peroxidase do complexo haptoglobina-hemoglobina usando como substrato o-dianisidina (Matos *et al.*, 2014).

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade foi testada com o teste de Shapiro-Wilk. As estatísticas descritivas são apresentadas como média \pm desvio padrão (SEM) ou mediana (intervalo interquartil range) [Med (IQR)]. A comparação entre os valores de tendência central foi feita por meio do teste *t-student* de medidas independentes e ANOVA fatorial ou testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A correlação entre variáveis contínuas foi realizada pelos coeficientes de correlação de Spearman e análise de regressão linear (com determinação de equação).

Para analisar o impacto do tempo para completar a corrida, os atletas foram avaliados em variáveis fisiológicas e foram divididos em tercís (rápido: ≤ 3715 min, intermedio: 3715-4030 min e mais lento: ≥ 4030). Mais ainda, a velocidade média para completar a TransPortugal variou entre 0,39 km/min para o mais rápido e 0,12 km/min para o último atleta. Desta forma, os grupos determinados por tercís de velocidade média foram: rápido ($\geq 0,31$ km/min), intermédio (0,29-0,31 km/min) e lento ($\leq 0,29$ km/min).

A variação no volume plasmático (ΔPV) depois do exercício foi calculada utilizando a equação de Dill e Costill: $\Delta PV (\%) = 100 \times [HbPre / HbPost) \times (100-HtcPost) / (100-HtcPre) -1]$, (Hb, hemoglobina, Htc, hematócrito, pré, pré-corrida, pós, pós-corrida) (Alis *et al.*, 2015; Dill & Costill, 1974). Os valores pós-corrida foram corrigidos para hemoconcentração [Pós-corrida corrigida = Pós-corrida não corrigida $\times (1 + \Delta PV (\%) / 100)$]. A diferença entre as medidas para cada variável de corrida pré e pós foi calculada para cada participante [$\Delta\% = 100 * (Pós-corrida corrigida - Pré-corrida / Pré-corrida)$].

O ANCOVA unidirecional foi conduzido para determinar uma diferença estatisticamente significativa entre as variantes genéticas e os parâmetros circulantes.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS versão 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o pacote GraphPad Prism (GraphPad Prism 6, Software Inc. La Jolla, EUA). A significância foi atribuída se $P < 0,05$.

3.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as considerações constantes na Declaração de Helsínquia (Association). Este estudo foi aprovado pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte e do Centro Académico de Medicina de Lisboa. Todos os participantes receberam informação detalhada do projeto por e-mail e no local da prova (Bragança). Foram explicados os objetivos, métodos, benefícios e riscos associados com a recolha das amostras biológicas. Os participantes foram informados de que podiam recusar a sua participação ou desistir em qualquer momento. Para participar no estudo foram recolhidos imperativamente os consentimentos informados devidamente assinados.

CAPÍTULO IV

– Resultados & Discussão –

CAPÍTULO IV.I

- Ecosystema & Estrutura Dos Atletas -

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ECOSISTEMA E ESTRUTURA DOS ATLETAS

4.1.1. CARACTERÍSTICAS DA PROVA

As condições médias de temperatura e humidade durante o evento foram de $17,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ($14,9$ a $18,7^\circ\text{C}$) e $54,7 \pm 6,2\%$ ($49,0\%$ a $64,0\%$), respetivamente. As temperaturas médias e as humidades de cada etapa estão ilustradas na Figura 6, tendo sido obtidas de acordo com os registos do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

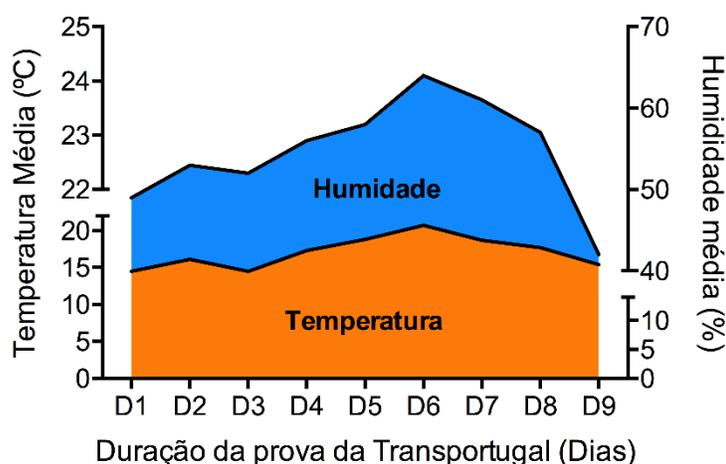


Figura 6: Condições médias de temperatura e humidade durante a ultramaratona de ciclismo de montanha TransPortugal.

Esta ultramaratona apresenta um perfil extenuante e de longa duração com influência considerável em todo o corpo devido ao impacto das superfícies duras, especialmente refletido ao nível dos membros inferiores, coluna e braços. O nível de exigência desta prova poderá ser observado na Figura 7, tendo em conta o efeito cumulativo das altimetrias. De facto, a corrida da TransPortugal caracteriza-se por um alto nível de requisitos técnicos e por condições adversas de rotas, ao longo de todos os dias (com distâncias compreendidas de 95 km a 162 km), com um desnível total de 24 500 m, de trilhos florestais, estradas de cascalho e trilhos estreitas, íngremes penhascos.

4.1.2. ESTRUTURAS DOS ATLETAS: CARACTERÍSTICAS

Dos 76 atletas inscritos na 11.^a edição da TransPortugal, 55 aceitaram participar no estudo. Para cinco destes participantes não foi possível recolher informação após a prova por várias razões, nomeadamente, por não completarem o mínimo de três etapas (n=1), acidentes durante o percurso (n=3) e um atleta recusou-se a participar novamente no estudo.

Os participantes eram atletas amadores saudáveis de 20 nacionalidades, representantes dos 5 continentes (principalmente caucasianos, 92,7%) (Figura 8).

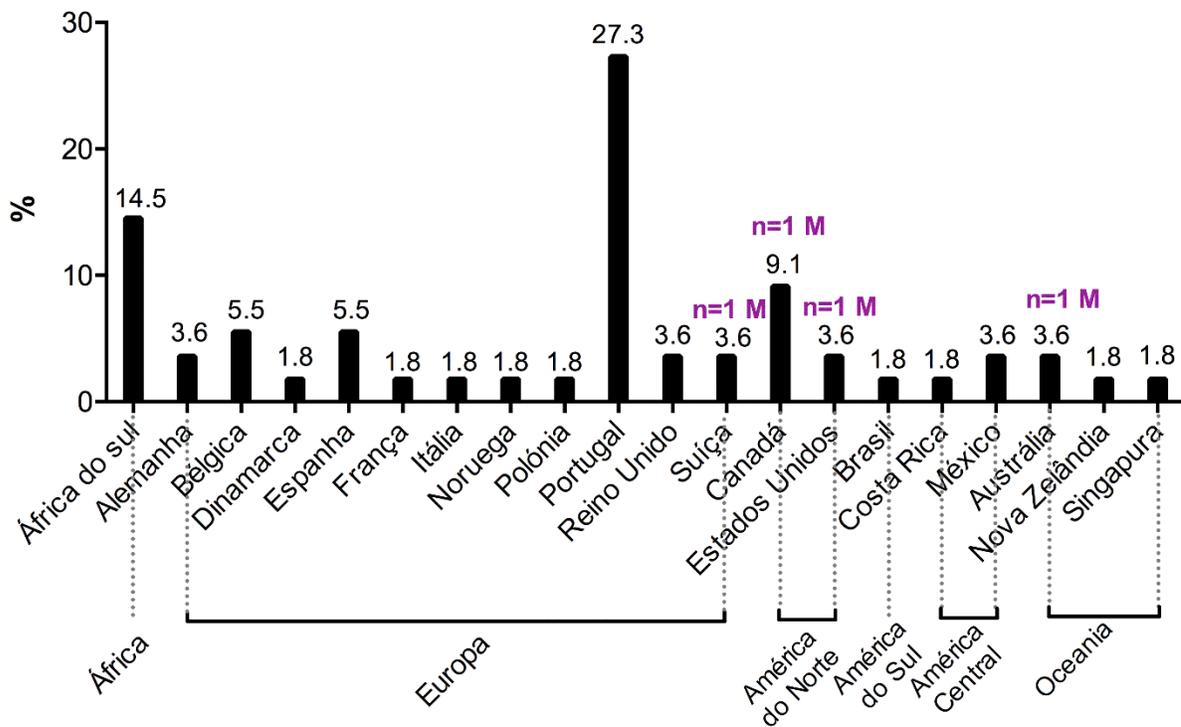


Figura 8: Nacionalidade representadas na 11.^a edição da corrida da TransPortugal. M – Mulheres.

De todos os atletas que aderiram a este estudo, com informações relativas a antes e após a prova (n=50), 37 completaram as nove etapas da TransPortugal. Desta forma, os atletas foram separados em dois grupos: um grupo (9 etapas) para os atletas que completaram todas as etapas (n=38, antes da prova e n=37, no final da corrida) e os restantes atletas foram reclassificados em outro grupo (< 9 etapas) (n=16, antes da prova e n=13, no final da mesma).

Para os atletas que terminaram todas as etapas (n=37), foram reclassificados em tercios de acordo com o tempo necessário para completar a prova. Para além desta análise, os atletas foram estratificados de acordo com a velocidade média para terminar a prova. A velocidade média para completar TransPortugal variou entre 0,39 km/min para o mais rápido e 0,12 km/min para o último atleta. Desta forma, os grupos determinados por tercios de velocidade média foram: rápido ($\geq 0,31$ km/min), intermédio (0,29-0,31 km/min) e lento ($\leq 0,29$ Km/min).

4.1.3. COMPOSIÇÃO CORPORAL, ESTADO NUTRICIONAL E PREPARAÇÃO FÍSICA

4.1.3.1. ANTROPOMETRIA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Os dados antropométricos foram recolhidos antes e depois da corrida, enquanto as medidas de cintura e outras medidas da composição corporal, como massa gorda (MG) e massa livre de gordura (MLG), foram determinadas antes da corrida, em repouso, por bioimpedância. A bioimpedância não foi determinada após exercício físico, devido às alterações metabólicas consideráveis como a desidratação ou sudoração excessiva (Hodgdon, Friedl, Beckett, Westphal, & Shippee, 1996); fatores estes que comprometeriam a fiabilidade dos resultados (Rossi & Tirapegui, 2001) e de acordo com o protocolo do próprio equipamento (RJL Systems). Os resultados expostos nesta secção representam o perfil de base dos participantes relativamente à composição corporal entre géneros (Tabela 2), de acordo com as etapas que terminaram (Tabela 3) e pela velocidade que completaram a prova (Tabela 4).

Apesar de contarmos com um universo muito reduzido de mulheres (7,3%), verificamos algumas diferenças significativas concomitantes às claras distintas características estruturais adjacentes (Tabela 2). Na TransPortugal o vencedor é o indivíduo que conclua todas as etapas no menor tempo possível. Dado este critério e uma vez que as mulheres apresentam uma estrutura corporal diferente da dos homens, que poderia comprometer o seu desempenho, a organização criou um sistema de *handicaps*, descrito anteriormente, que adequa o género feminino e a idade às condições estruturais, capacidades e ao desempenho físico.

As características iniciais da população em relação às medidas antropométricas e de composição corporal em estudo, descritas na Tabela 2, apontam essas diferenças. Segundo Lepers e Stapley, as diferenças entre o gênero em atletas de elite são de aproximadamente 10% (Lepers & Stapley, 2016). Os homens têm um coração anatomicamente maior, as concentrações da hemoglobina são mais elevadas e, conseqüentemente, um VO_{2max} superior. Tendencialmente, as diferenças entre os gêneros nos desportos extremos e de resistência atenuam-se com o avançar da idade (Lepers & Stapley, 2016).

Antes da prova, verificaram-se diferenças significativas na composição corporal entre os gêneros, nomeadamente no peso que foi inferior nas mulheres e que se repercute no índice de massa corporal (IMC) ($P < 0,0001$). Após a prova, as mulheres perdem mais peso relativamente aos homens, refletindo-se no IMC ($P = 0,005$) (Tabela 2).

Em relação aos compartimentos corporais, o valor da percentagem de MG das mulheres foi superior ao dos homens (22,4% *versus* 17,4%, respetivamente) ($P < 0,0001$), e a MLG (%) apresentou valores contrários que refletem as diferenças entre os gêneros, 82,6% para os homens e 77,5% para as mulheres ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Dado o treino exigente para quem compete neste tipo de provas, existe uma tendência, tanto nos homens como nas mulheres, para perder MG, em virtude da manutenção da MLG para o desempenho, além de que existe um consumo metabólico importante das reservas de tecido adiposo, embora não tenha sido realizada a bioimpedância no final da prova, para comprovar esta tendência. Estudos similares de exercícios físicos extenuantes como o reportado pelo estudo de Chlíbková *et al.*, 2014, os atletas apresentaram o mesmo perfil encontrado na nossa população, principalmente em relação à MG (Chlibkova *et al.*, 2014).

A MG não foi estimada através das pregas cutâneas, recorrendo-se à BIA para a avaliação da composição corporal, entretanto foi estimada recorrendo às equações de Deurenberg e Gallagher, comparando com os valores da BIA (Tabela 2). Foram escolhidas estas duas equações por estarem baseadas na idade, no gênero e no IMC, consideradas as mais adequadas em função da diversidade da população estudada, sendo de 20 nacionalidades diferentes. A percentagem de gordura corporal (GC%) estimada pelas equações antropométricas e comparada com os valores gerados pela bioimpedância foi estudada através da análise de Blant-Altman (Bland & Altman,

1999), que compara a diferença das médias em relação ao erro absoluto, quando confrontada com as médias globais dos dois métodos; é representada por um gráfico de pontos, considerando os limites de confiança, que são calculados pela média obtida dos dois métodos $\pm 1,90 \cdot DP$ com um nível de confiança de 95% (Figura 9). A representação dos limites de confiança permite uma visualização da possível concordância entre os métodos comparados (B. Knechtle *et al.*, 2011).

No entanto, de acordo com as equações antropométricas de predição da percentagem da Gordura Corporal (%GC), verificaram-se diferenças significativas para perdas na MG para ambos géneros no final da prova ($P < 0,0001$, para ambas as equações) (Tabela 2). Segundo a equação de Deurenberg, as mulheres apresentaram um valor médio de %MG superior ao dos homens ($31,0 \pm 1,1\%$ versus $23,3 \pm 0,4\%$, respetivamente, $P < 0,0001$) (Tabela 2). Tal como a equação de Gallagher; a estimativa segundo esta equação evidenciou que as mulheres apresentaram valores significativamente inferiores em relação Deurenberg ($27,6 \pm 1,5\%$ versus $20,2 \pm 0,4\%$ respetivamente ($P < 0,0001$) (Tabela 2). De referir que os valores da %MG estimados pelas equações sobrestimam os valores obtidos pela bioimpedância (Tabela 2). Podemos, desta forma, verificar a variação de peso no final da prova.

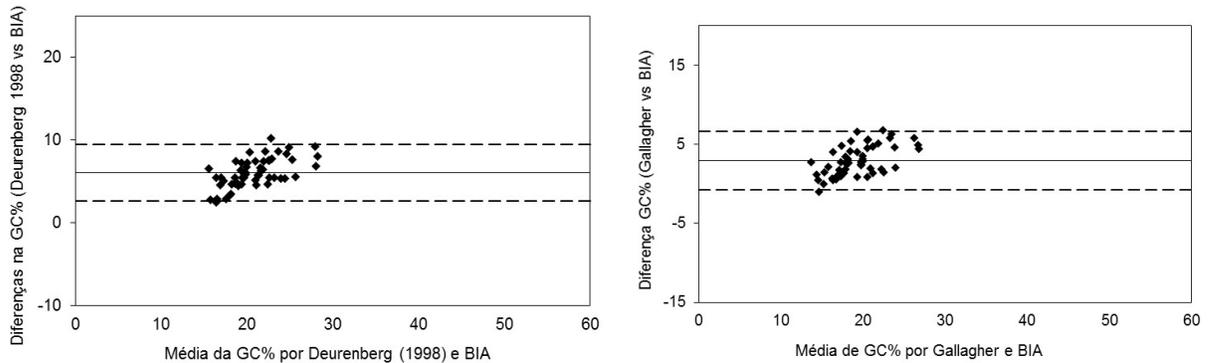


Figura 9: Análise Bland-Altman para comparar a percentagem de GC estimada pela aplicação de equações antropométricas e pelo método de BIA.

A massa muscular esquelética (MME) e o tecido mole magro (TMM) que compreendem todos os compartimentos corporais, exceto a massa mineral óssea (MMO) e a MG determinadas por bioimpedância, apresentaram também diferenças significativas, com valores inferiores nas mulheres ($P < 0,05$) (Tabela 2). De acordo com outros autores, os homens apresentam mais MME, repercutindo as diferenças nos restantes compartimentos livres de gordura, para além de apresentarem menos MG e

um maior volume de MME por unidade de peso corporal (Armstrong, Johnson, McKenzie, Ellis, & Williamson, 2016) (Cheuvront, Carter, Deruisseau, & Moffatt, 2005; Witard, Jackman, Kies, Jeukendrup, & Tipton, 2011). Neste tipo de provas, a melhoria da MME poderá influenciar o desempenho nas atividades que envolvam a aplicação de uma potência maior e, conseqüentemente de maior força, como acontece nos percursos que são planos e rápidos, onde a potência poderá chegar aos 450 watts. Estas situações igualmente ocorrem nas subidas e nos pontos de escalada, quando o ciclista deve exercer uma força muito maior para suportar o seu próprio peso, além do equipamento e da inclinação do terreno que deve ser ultrapassada (H. Shin, P.-Y. Liu, L. B. Panton, & J. Z. Ilich, 2014). De facto, em provas de longa duração, o aumento da massa muscular será benéfico em ambos géneros (Bell, Furber, KA, Anton-Solanas, & Swart, 2017; H. Shin, P. Y. Liu, L. B. Panton, & J. Z. Ilich, 2014; Shin *et al.*, 2012).

Ao nível da MMO, as mulheres apresentaram valores absolutos significativamente inferiores ($P < 0,0001$), não se refletindo em valores percentuais (Tabela 2). Nas mulheres em pré-menopausa, a massa óssea depende da massa muscular (Kerr *et al.*, 2007). Existem fatores externos que podem afetar a variação da massa mineral óssea e massa muscular, nomeadamente, os fatores hormonais, o estilo de vida, a atividade física, a dieta, o conteúdo de cálcio, as vitaminas D e K (Levinger *et al.*, 2017; H. Shin *et al.*, 2014). Dadas as claras diferenças referidas e tal como seria de esperar, as mulheres apresentaram significativamente menos MMO por Kg de peso em relação aos homens (Tabela 2).

A água corporal total (ACT) e a água intracelular (ACI) foram significativamente inferiores nas mulheres em relação aos homens (Tabela 2). A ACI está contida dentro do tecido celular, refletindo o menor valor nas mulheres comparativamente aos homens devido a menor quantidade de TMM (Chlíbková *et al.*, 2014).

A taxa metabólica basal (TMB) foi significativamente superior nos homens (1842,0 kcal) em relação às mulheres (1482,3 kcal) ($P = 0,001$), situação igualmente apresentada em relação ao gasto energético diário (GED) (homens: 3868,3 kcal; mulheres: 2816,2 kcal, $P = 0,001$) (Tabela 2). A variação de peso entre géneros pode interferir nos valores relacionados com taxa metabólica basal e no gasto energético diário, uma vez que, para estes cálculos se utilizam o género, peso, altura e idade, tendo as mulheres

apresentado menores necessidades metabólicas sobretudo em função do peso e quase independente da idade, já que o fator de atividade é o mesmo entre os géneros (Harris & Benedict, 1918).

Na maior parte das modalidades desportivas, as competições são organizadas por género, onde as mulheres não competem com os homens; no entanto, na TransPortugal, ambos competem na mesma prova e como as classificações são individuais, considera-se o fator de *handicap* para o ajuste para o género e para a idade, tendo em vista que os homens e as mulheres têm uma estrutura e composição corporal diferente. Na nossa amostragem o número de representantes do género feminino é muito restrito, no entanto é interessante e notável que neste estudo a totalidade das mulheres (n=4) completou as nove etapas da prova com diferenças significativas e estiveram estratificadas no grupo dos atletas mais rápidos. As mulheres não apenas terminaram a prova, mas ficaram muito bem colocadas na classificação geral. O que nos permitiria dizer que, num futuro próximo, e de acordo com alguns autores, a diferença de género deixará de ser importante, principalmente na população dos atletas com mais de 40 anos ou classificados como máster (Lepers & Stapley, 2016). A justificação desta afirmação deverá ser motivo de estudos futuros, mas provavelmente estará de acordo com as variações hormonais e de níveis inflamatórios que este tipo de desporto extremo, exaustivo e prolongado pode causar.

Tabela 2. Características antropométricas e composição corporal por bioimpedância elétrica antes da prova da TransPortugal.

	Pré-corrida (n=55)				Pós-corrida (n=50)				P *	P *
	Total (n=55)	Mulheres (n=4)	Homens (n=51)		Mulheres (n=4)	Homens (n=4)	Homens (n=46)			
Idade, anos	44,8 ± 7,1	47,8 ± 2,4	44,6 ± 1,0							
Altura, m	1,8 ± 0,01	1,7 ± 0,01	1,8 ± 0,01							
Peso, Kg	75,5 ± 1,3	58,5 ± 3,1	76,9 ± 1,2							
IMC, Kg.m ⁻²	24,1 ± 0,3	21,2 ± 1,1	24,3 ± 0,3							
Cintura, cm	80,9 ± 1,0	72,0 ± 2,4	81,6 ± 1,0							
Equações antropométricas GC, %										
Deurenberg 1991	-	31,0 ± 1,1	23,3 ± 0,4							
Gallagher 1996	-	27,6 ± 1,5	20,2 ± 0,4							
B/A										
Massa gorda, %	17,8 ± 0,4	22,4 ± 1,6	17,4 ± 0,3							
Massa gorda, Kg	13,4 ± 0,4	13,3 ± 1,5	13,5 ± 0,4							
Massa livre de gordura, %	83,2 ± 0,4	77,5 ± 1,6	82,6 ± 0,3							
Massa livre de gordura, Kg	62,1 ± 1,1	45,1 ± 1,5	63,4 ± 0,9							
Massa magra seca, %	21,5 ± 0,6	20,0 ± 0,4	21,6 ± 0,6							
Massa magra seca, Kg	20,1 ± 3,5	11,6 ± 0,5	20,7 ± 3,8							
Tecido mole magro, % [†]	78,2 (76,5-79,2)	72,0 (71,4-74,9)	78,4 (77,0-79,4)							
Tecido mole magro, Kg [†]	58,8 (54,0-63,9)	42,9 (40,5-44,6)	59,5 (55,4-64,2)							
Massa muscular esquelética, % [†]	41,5 (40,3-42,9)	35,7 (34,5-37,4)	41,6 (40,6-43,1)							
Massa muscular esquelética, Kg [†]	31,7 (29,1-33,4)	22,1 (19,7-22,3)	31,9 (29,7-33,6)							
Massa mineral óssea, %	4,5 ± 0,04	4,4 ± 0,2	4,5 ± 0,05							
Massa mineral óssea, Kg	3,3 ± 0,1	2,6 ± 0,05	3,4 ± 0,05							
Água corporal total, %	60,4 ± 0,6	57,6 ± 1,3	60,1 ± 0,7							
Água corporal total, L	45,4 ± 0,7	33,5 ± 1,0	46,4 ± 0,6							
Água intracelular, %	34,8 ± 0,4	30,9 ± 0,7	35,2 ± 0,4							
Água intracelular, L	26,2 ± 0,4	18,0 ± 0,5	26,9 ± 0,3							
Água extracelular, %	25,5 ± 0,2	26,6 ± 0,7	25,5 ± 0,2							
Água extracelular, L	19,2 ± 0,3	15,2 ± 0,5	19,5 ± 0,3							
Taxa metabólica basal, kcal [†]	1841,8 (1722,2-1939,4)	1482,3 (1431,3-1521,5)	1842,0 (1753,0-1941)							
Gasto energético diário, kcal [†]	3867,8 (3616,5-4072,7)	2816,2 (2720,0-2891,0)	3868,3 (3681,3-4075,1)							

Os dados são apresentados como média ± SEM ou mediana (intervalo interquartil) de acordo com o teste da normalidade; * Valor P calculado usando comparação de médias entre grupos independentes (teste de t student), exceto quando mencionado de outra forma; † comparação entre pré e pós-corrida com o teste de Mann-Whitney.

Em relação à análise dos atletas de acordo com as etapas realizadas, os atletas que concluíram todas as etapas (9 etapas) apresentaram valores significativamente inferiores nas percentagens da ACT, AIC e AEC em relação ao outro grupo (< 9 etapas) ($P < 0,05$) (Tabela 2). Durante a TransPortugal, não houve nenhum tipo de controlo na ingestão de água ou líquidos. O consumo foi totalmente *Ad Libitum*. Alguns autores comentam que os praticantes deste tipo de atividades, em geral, apresentam-se normalmente eu-hidratados e por vezes hiper-hidratados. Esta última situação reflete-se sobretudo devido ao receio das consequências da desidratação provenientes das perdas que ocorrem por meio da transpiração, respiração e do esforço. Para além disso, em provas de longa duração como na TransPortugal, as perdas hídricas e as condições climatéricas adversas poderão comprometer o desempenho do atleta na prova (Beat Knechtle, Duff, Schulze, & Kohler, 2008). No entanto, estes efeitos não foram confirmados, uma vez que não temos estes valores ACT, AIC e AEC após a prova.

Os atletas que concluíram as nove etapas apresentaram valores inferiores da %GC, calculada segundo as equações de predição de gordura corporal ($P < 0,0001$) (Tabela 3). Ainda mais, verificou-se que os indivíduos com nove etapas apresentaram menor percentagem de TMM ($P = 0,039$) (Tabela 3). Situação que poderia ser um contrassenso segundo alguns autores. (Shin *et al.*, 2012).

Quando fazemos uma retrospectiva dos últimos anos e tentamos comparar os resultados desta edição da TransPortugal com outras edições, visto que a TransPortugal é uma corrida que se repete ano após ano e já está na 15.^a edição, os atletas são reincidentes, repetindo a corrida mais de uma vez, provavelmente pelas belas paisagens, pelo rigor da prova, pela organização dedicada e claramente pelo calor e hospitalidade dos portugueses. Constatamos que o género feminino tem ficado muito bem posicionado, dentro do universo do ciclismo de montanha, as mulheres estão classificadas como: 1.^o lugar na classificação geral da 13.^a edição, conseguindo um 2.^o lugar na 10.^a edição, 16.^o lugar na 11.^a edição. Todas são atletas master, com idades compreendidas entre os 40 e 54 anos. Resumidamente, a classificação geral dos atletas nos últimos anos foi:

10.^a TransPortugal (2012): 1.º Vítor Gamito, Portugal, 42 anos, 2% de *handicap*, 49:45:00; 2.º Kate Aardel, Noruega, 40 anos, 14% de *handicap*, 51:53:13, 1160 km.

11.^a TransPortugal (2013): 1.º Vítor Gamito, Portugal, 43 anos; 46:42:30; 16.º Meg Carrigam, Austrália, 52 anos, 23% de *handicap*, 57:35:35, 1162 km.

12.^a TransPortugal (2014): 1.º José Silva 0%, 44:29:51; 2.º Kate Aardel, Noruega, 42 anos, 16% de *handicap*, 40:42:05, 1023 km.

13.^a TransPortugal (2015): 1.^a Kate Aardal, Noruega, 42 anos, 16% de *handicap*, 40:42:05; 2.º Alexandre Guilhoto, Portugal, 29 anos, 0% de *handicap*, 41:36:26, 1023 km.

14.^a TransPortugal (2016): 1.º José Silva, 38 anos, 0%, 39:55:20; 25.º Judith Locher; Suíça, 54 anos, 23% de *handicap*, 50:45:16.

15.^a TransPortugal (2017): 1.º Daniel Hoedemaekers, Holanda, 46 anos, 5% de *handicap*; 38:41:33; 2.º Marco Macedo, Portugal; 39 anos, 40:39:34.

Tabla 3: Comparações das medidas antropométricas e composição corporal, obtidas por bioimpedância elétrica antes da prova da TransPortugal, entre atletas que completaram (n=37) em relação aos que não completaram (n=13) os nove percursos do ultramaratona de ciclismo TransPortugal

	Pré-corrida (n=55)		Pós-corrida (n=50)		P *	P *
	<9 etapas (n=16)	9 etapas (n=38)	<9 etapas (n=13)	9 etapas (n=37)		
Idade, anos						
Altura, m						
Peso, Kg	74,2 ± 2,3	75,8 ± 1,6	71,2 ± 2,6	73,1 ± 1,5	0,577	0,516
IMC, Kg.m ⁻²	23,9 ± 0,5	24,1 ± 0,4	22,9 ± 0,6	23,2 ± 0,3	0,769	0,779
Cintura, cm	79,5 ± 1,8	81,3 ± 1,1	-	-	0,386	-
Equações antropométricas GC, %						
Deurenberg 1991	31,0 ± 1,1	23,3 ± 0,4	30,3 ± 1,0	21,9 ± 0,4	<0,0001	<0,0001
Gallagher 1996	27,6 ± 1,5	20,2 ± 0,4	27,5 (24,5-29,0)	18,6 (16,1-20,8)	<0,0001	<0,0001 †
B/A						
Massa gorda, %	17,0 ± 0,6	18,0 ± 0,4			0,166	
Massa gorda, Kg	12,6 ± 0,6	13,7 ± 0,4			0,141	
Massa livre de gordura, %	83,0 ± 0,6	82,0 ± 0,4			0,166	
Massa livre de gordura, Kg	61,6 ± 2,0	62,2 ± 1,3			0,831	
Massa magra seca, %	20,0 ± 0,9	22,0 ± 0,7			0,120	
Massa magra seca, Kg	15,0 ± 1,0	22,2 ± 5,1			0,370	
Tecido mole magro, % †	78,9 (78,3-79,9)	77,4 (75,9-78,9)			0,039	
Tecido mole magro, Kg †	57,8 (54,4-63,6)	59,5 (53,1-64,1)			0,850	
Massa muscular esquelética, % †	42,1 (41,3- 43,6)	41,0 (40,1 to 42,9)			0,097	
Massa muscular esquelética, Kg †	30,4 (29,7-33,4)	32,1 (27,9-33,5)			0,649	
Massa mineral óssea, %	4,6 ± 0,1	4,4 ± 0,1			0,137	
Massa mineral óssea, Kg	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1			0,839	
Água corporal total, %	63,0 ± 1,1	59,5 ± 0,7			0,009	
Água corporal total, L	46,6 ± 1,4	45,0 ± 0,9			0,322	
Água intracelular, %	36,6 ± 0,9	34,2 ± 0,5			0,012	
Água intracelular, L	27,1 ± 0,8	25,9 ± 0,5			0,235	
Água extracelular, %	26,5 ± 0,3	25,2 ± 0,3			0,025	
Água extracelular, L	19,6 ± 0,6	19,1 ± 0,4			0,501	
Taxa metabólica basal, kcal †	1807,8 (1735,1-1931,9)	1854,8 (1710,2-1939,8)			0,805	
Gasto energético diário, kcal †	3796,4 (3643,7-4057,0)	3895,3 (3591,5-4073,5)			0,370	

Os dados são apresentados como média ± SEM ou mediana (intervalo interquartil) de acordo com a teste da normalidade; * Valor P calculado usando comparação de médias entre grupos independentes (teste de t student), exceto quando mencionado de outra forma; † comparação entre pré e pós-corrida com o teste de Mann-Whitney;

Na Tabela 4, caracterizaram-se os parâmetros antropométricos e composição corporal tendo em conta a estratificação dos ciclistas em relação à velocidade média para terminar a prova.

Os atletas mais lentos eram significativamente mais velhos ($P=0,008$), apresentavam uma %MG superior ($P=0,010$) e menos %MLG ($P=0,010$) em relação aos outros grupos. A percentagem de TMM ($P=0,016$) e de %MME ($P=0,025$) também foi menor no grupo dos atletas mais lentos. As ACT, AIC e AEC em valores absolutos também foram inferiores no grupo dos mais lentos, valores concordantes com outros autores (Ritz, 2000).

Os atletas mais lentos apresentaram %MG superior, tal como referido por outros autores (H. Shin *et al.*, 2014). Este facto poderá reforçar a hipótese de que a presença de massa gorda poderá comprometer o desempenho deste tipo de exercício exaustivos de longa duração, uma vez que os músculos esqueléticos e cardíacos não estarão a ser utilizados convenientemente, para uma melhor gestão do esforço e uma melhor utilização de tecidos fisiologicamente.

Tabela 4: Relação das medidas antropométricas e composição corporal, obtidas por bioimpedância elétrica antes da prova da TransPortugal com a velocidade média de terminar a prova.

	Pré-corrida (n=55)			Pós-corrida (n=50)			P *
	Lentos	Intermédios	Rápidos	Lentos (n=18)	Intermédios (n=10)	Rápidos (n=22)	
Idade, anos	47,6 ± 1,4	39,10 ± 2,3	44,6 ± 1,3	44,6 ± 1,3	0,008 ^a	-	-
Altura, m	1,7 ± 0,02	1,8 ± 0,02	1,8 ± 0,01	1,8 ± 0,01	0,107	-	-
Peso, Kg	71,9 ± 2,6	74,0 ± 2,9	78,1 ± 1,6	78,1 ± 1,6	0,098	-	-
IMC, Kg.m ²	23,7 ± 0,5	23,8 ± 0,7	24,4 ± 0,4	24,4 ± 0,4	0,540	-	-
Cintura, cm	79,9 ± 1,6	77,8 ± 2,7	82,4 ± 1,4	82,4 ± 1,4	0,200	-	-
Equações antropométricas GC, %							
Deurenberg 1991	25,6 ± 1,0	21,4 ± 0,9	23,3 ± 0,6	23,3 ± 0,6	0,010 ^b	24,5 ± 1,0	20,1 ± 0,8
Gallagher 1996	22,2 ± 1,0	18,7 ± 1,0	20,2 ± 0,6	20,2 ± 0,6	0,040 ^d	21,0 ± 1,0	17,1 ± 0,8
Massa gorda, %	19,2 ± 0,7	16,3 ± 0,6	17,3 ± 0,5	17,3 ± 0,5	0,010 ^f	-	-
Massa gorda, Kg	13,7 ± 0,6	12,1 ± 0,8	13,5 ± 0,5	13,5 ± 0,5	0,239	-	-
Massa livre de gordura, %	80,6 ± 0,7	83,7 ± 0,6	82,7 ± 2,3	82,7 ± 2,3	0,010 ^a	-	-
Massa livre de gordura, Kg	58,1 ± 2,2	61,9 ± 2,3	64,5 ± 1,3	64,5 ± 1,3	0,035 ^h	-	-
Massa magra seca, %	21,6 ± 0,9	22,4 ± 1,4	20,9 ± 0,9	20,9 ± 0,9	0,620	-	-
Massa magra seca, Kg	15,7 ± 1,6	16,8 ± 1,6	24,5 ± 7,7	24,5 ± 7,7	0,530	-	-
Tecido mole magro, % [†]	77,1(75,6-78,7)	79,4(77,4-80,6)	78,4(77,0-79,5)	78,4(77,0-79,5)	0,016 ⁱ	-	-
Tecido mole magro, Kg [†]	54,6(46,8-61,3)	58,8(57,2-60,4)	59,4(56,2-65,1)	59,4(56,2-65,1)	0,158	-	-
Massa muscular esquelética, % [†]	40,6(37,8-42,3)	42,4(41,5-43,9)	41,6(40,5-43,1)	41,6(40,5-43,1)	0,025 ^j	-	-
Massa muscular esquelética, Kg [†]	29,3(26,4-32,9)	31,2(29,5-32,9)	32,0(30,3-34,7)	32,0(30,3-34,7)	0,061	-	-
Massa mineral óssea, %	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1	4,5 ± 0,1	4,5 ± 0,1	0,513	-	-
Massa mineral óssea, Kg	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	0,017	-	-
Água corporal total, %	59,3 ± 1,1	61,3 ± 1,6	61,1 ± 0,9	61,1 ± 0,9	0,416	-	-
Água corporal total, L	42,4 ± 1,4	45,0 ± 1,3	47,5 ± 1,0	47,5 ± 1,0	0,009 ^k	-	-
Água intracelular, %	33,9 ± 0,8	35,8 ± 1,0	35,4 ± 0,6	35,4 ± 0,6	0,214	-	-
Água intracelular, L	24,3 ± 0,9	26,3 ± 0,7	27,5 ± 0,5	27,5 ± 0,5	0,005 ^l	-	-
Água extracelular, %	25,4 ± 0,4	25,5 ± 0,6	25,7 ± 0,4	25,7 ± 0,4	0,836	-	-
Água extracelular, L	18,2 ± 0,5	18,8 ± 0,6	20,1 ± 0,5	20,1 ± 0,5	0,023 ^m	-	-
Taxa metabólica basal, kcal [†]	1735,4(1568,6-1879)	1831,2(1795,0-1867,7)	1888,3(1772,0-1965,0)	1888,3(1772,0-1965,0)	0,102	-	-
Gasto energético diário, kcal [†]	3644,2(3294,0-3947)	3845,5(3769,6-3922,3)	3965,4(3721,3-4128,3)	3965,4(3721,3-4128,3)	0,102	-	-

* Grupos determinados por t-test de velocidade média (rápido, ≥0,31 km/min; Intermidiário, 0,29-0,31 km/min; Lento ≤0,29 km/min). Comparações entre grupos utilizando ANOVA de medidas independentes com Tukey pós-hoc ou † Kruskal-Wallis seguidas de testes de Mann-Whitney. a, rápidos vs intermédios (P=0,003); b, rápidos vs intermédios (P=0,009), rápidos vs lentos (P=0,047); c, rápidos vs intermédios (P=0,005), rápidos vs lentos (P=0,039); d, rápidos vs intermédios (P=0,030); e, rápidos vs intermédios (P=0,014); f, rápidos vs intermédios (P=0,010) e rápidos vs lentos (P=0,022); g, rápidos vs intermédios (P=0,010) e rápidos vs lentos (P=0,022); h, rápidos vs lentos (P=0,011); i, rápidos vs intermédios (P=0,004); j, rápidos vs intermédios (P=0,012), rápidos vs lentos (P=0,049); k, rápidos vs lentos (P=0,004); l, rápidos vs lentos (P=0,002); m, rápidos vs lentos (P=0,009); Dados expressos como SEM médio, ou como mediana (intervalo interquartil) de acordo com a normalidade.

4.1.3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS HÁBITOS ALIMENTARES

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da ingestão média diária de energia, macronutrientes e constituintes de interesse na população em estudo. O consumo energético diário foi de 2597,5 kcal na amostra geral, sendo que a média calórica foi de 2060,6 kcal para o grupo que **não** terminou as nove etapas e de 2488,7 kcal para o outro grupo. É de suma importância referir que estes valores fazem referência à ingestão habitual dos atletas durante o ano, considerando as variações sazonais e de acordo com a oferta de nutrientes nas regiões onde vivem, uma vez que temos indivíduos de diversas nacionalidades numa mesma prova. Utilizou-se um questionário de frequência alimentar (QFA) (Lopes *et al.*, 2007; Slater, Philippi, Marchioni, & Fisberg, 2003), e em função de que a prova é realizada em Portugal e conta com atletas portugueses, utilizou-se o QFA validado para a população Portuguesa (Lopes, Aro *et al.* 2007).

Em relação ao aporte proteico, observa-se que o valor médio de ingestão proteica é de 1,3 g/kg de peso/dia, valor que está dentro da DRI, no entanto com uma atividade bastante intensa e vigorosa, justificaria uma dieta com um teor mais elevado em proteínas, com valores que poderiam chegar facilmente entre os 1,8-2,0 g/kg de peso/dia, e a percentagem do Valor Energético Total (VET) que é de 10 a 35%, de acordo com o AMRD (Potgieter, 2013).

A proteína é um nutriente que requer especial atenção, principalmente para os atletas submetidos a um desgaste prolongado, uma vez que a proteína neste contexto tem como uma das funções principais a recuperação inerente ao desgaste físico, além da adaptação fisiológica ao excesso de treinamento e à própria competição (Witard *et al.*, 2011). As necessidades proteicas dos atletas de endurance são maiores do que aquelas indicadas para os atletas em geral, em função da recuperação do tecido lesado e na síntese de novas proteínas musculares (Williamson, 2016). Alguns autores chamam a atenção para o facto da ingestão de alguns aminoácidos específicos serem limitantes de um adequado aporte proteico quando em quantidade diminuída e justificam a importância na quantidade dos aminoácidos neutros de cadeia ramificada (AACR), como a leucina, isoleucina e valina, e também como poupadores no uso do ATP e no consumo do glicogénio muscular, além de ter uma conformação favorável à sua utilização mais eficaz para a gliconeogénese (Thomas, Erdman, & Burke, 2016a; Witard *et al.*, 2011).

Os AACR são transaminados em cetoácidos através de aminotransferases, com subsequente oxidação ocorrendo através da enzima cetoácido desidrogenase de cadeia

ramificada (AODCR). O grupo alfa-amínico-N é geralmente transaminado com alfa-cetoglutarato para formar glutamato, que é então transaminado com piruvato para formar alanina aminotransferase (ALT) ou aminado através de glutamina sintetase para formar glutamina. A enzima AODCR é limitante na taxa de oxidação dos AACR, e esta correlação inversa com a AODCR apoia o facto de que as estratégias para garantir a disponibilidade de hidratos de carbono (HC) durante o exercício devem ter um efeito poupador na oxidação dos aminoácidos referidos mediado pelo AODCR durante o exercício de resistência (Tarnopolsky, 2004).

Os atletas que terminaram todas as etapas apresentam uma ingestão média inferior de proteínas, sem diferenças estatisticamente significativas (Tabela 5). De acordo com a informação prestada pelos atletas, a grande maioria relata a utilização de forma rotineira da suplementação com AACR, durante os treinos intensos. Estes AA diminuem a fadiga central, pois competem com o triptofano, precursor da serotonina no transporte para o SNC e também para a ligação dos ácidos gordos livres (AGL) à albumina que liga também o triptofano.

Para avaliar ingestão de aminoácidos, utiliza-se como padrão de referência a RDA (Recommended Dietary Allowances) e não o DRI (Dietary References Intake), e encontramos valores indicativos para adultos com mais de 19 anos, com valores de mg/kg/dia. É importante salientar que na recomendação da ingestão de aminoácidos, mesmo que a recomendação possa ser elevada, estas referências são feitas para a população em geral e, portanto, se direcionarmos a recomendação para atletas de atividades exaustivas e prolongadas, corremos riscos de mesmo assim apresentar alguma inadequação no consumo de aminoácidos específicos, que em alguns casos poderia ser colmatada com a suplementação (Instituto of Medicine, 2003).

Comparamos os resultados encontrados na população dos ciclistas e encontramos resultados muitos semelhantes na ingestão de aminoácidos essenciais no estudo NHANES III para adultos entre 30 e 50 anos. (Instituto of Medicine, 2003).

Os hidratos de carbono mantêm valores de aproximadamente 3,5 g/kg/dia, e a DRI apresenta valores mais elevados para atividades desta envergadura, normalmente os valores oscilam entre 8 a 12 g/kg/dia (Thomas, Erdman, & Burke, 2016b). A percentagem do Valor Energético Total (VET) deve ser de 45 a 65% do VET, de acordo com AMRD. Muitos autores comentam a necessidade de uma carga elevada de hidratos de carbono na alimentação normal de um atleta que compete em provas de endurance (Thomas *et al.*, 2016a). Uma

compensação com uma carga grande de hidratos de carbono pode melhorar a performance ou eficácia e, além disso, atletas bem treinados conseguem armazenar maior quantidade de glicogénio tanto no músculo como no fígado sem a necessidade de fazer dietas de descarga para esgotar as reservas e posteriormente aumentar a absorção e o armazenamento de glicose nos tecidos (Gonzalez, Fuchs, Betts, & van Loon, 2016). Jeukendrup defende uma maior ingestão de hidratos de carbono para uma melhor performance nos exercícios exaustivos e de longa duração que deveria ser de 60 g/h independente do tipo de hidrato de carbono, e que deve ser feita de maneira adequada, com um consumo importante durante os dias precedentes à competição e até 3-4 horas antes. Evita-se assim o consumo de hidratos de carbono simples nos 60 minutos antecedentes à atividade física, devido à consequente hipoglicemia e da hipersecreção de insulina, que pode ser bastante prejudicial para o atleta, já que poderia conduzir a uma inibição da lipólise, que levaria a um consumo do glicogénio muscular acelerado (Jeukendrup, 2011).

A ingestão de carboidratos (CHO) leva a um efeito de poupança importante na oxidação dos aminoácidos, e estes são o combustível de eleição para os desportos de endurance onde se pode esgotar facilmente as reservas (Tarnopolsky, 2004). Os atletas da TransPortugal tiveram valores médios baixos, mas ao separarmos os grupos entre os que concluíram as nove etapas e os que não o fizeram, houve diferenças importantes. Os que terminaram todas as nove etapas da prova apresentaram valores mais elevados no consumo do que os que não completaram todas as etapas, no entanto não há diferenças significativas, simplesmente poderíamos pensar que os atletas tinham um melhor aporte de hidratos de carbono e tiveram um melhor resultado em relação à performance, desempenhando melhor a atividade em si, com mais energia e facilidade no pedalar a bicicleta (Helge, 2017).

As gorduras apresentam valores adequados, relativamente à DRI, com uma média de 1,2 g/kg/d, valor dentro dos parâmetros indicados que atualmente estão na ordem de 0,8 a 1,8 g/kg/d. Se falamos em percentagens do Valor Energético Total (VET), podemos dizer que a DRI se encontra entre os valores de 20-35% (Potgieter, 2013).

De acordo com as recomendações da *American Dietetic Association*, da *French Food Safety* e da *International Society of Fatty Acids and Lipids* (Kris-Etherton, Grieger, & Etherton, 2009), a quantidade de ingestão destes componentes pela população em estudo está muito aquém do que deveria ser uma ingesta mínima adequada, principalmente em relação aos hidratos de carbono; com valores bastante relevantes. Em relação às gorduras saturadas, recomenda-se que não seja superior a 7% dentro do VET, as gorduras monoinsaturadas

poderiam chegar até 20% do total da ingestão de gorduras, e as gorduras polinsaturadas não deveriam ser maiores do que 10% do VET, tendo em consideração a indicação das gorduras entre 20-35% da ingestão total de gorduras. Alguns autores correlacionam uma melhor proteção antioxidante com o consumo elevado de Omega 3 e Omega 6 (Calder, 2013). Os nossos atletas apresentaram um consumo adequado em relação a estes nutrientes. (Simopoulos, 2007). A contribuição do ponto de vista nutricional irá definitivamente interferir no desempenho desses atletas (Antonio, Ellerbroek, Silver, Vargas, & Peacock, 2016; Mahon, Hackett, Stott, George, & Davies, 2014).

Em relação ao consumo de álcool, é interessante notar que, embora não tenham obtido resultados significativos; as mulheres tiveram um consumo bastante superior ao dos homens, quase o dobro, e considerando as etapas, aqueles que concluíram todas as etapas apresentaram um consumo inferior. A ingestão de fibras é maior no grupo das mulheres, 32,5g *versus* 26,3 g para os homens. O consumo também foi superior no grupo que terminou todas as etapas.

Para avaliar a presença de inadequação da ingestão dos micronutrientes, utiliza-se uma comparação dos dados do consumo comparando com os valores da RDA, ou da AI (*Adequate Intake*), nos casos em que não exista uma RDA disponível, para o micronutriente em questão. No caso de avaliações em grupo, o ideal é a utilização do método de ponto de corte na EAR (*Estimated Average Requirement*), mas para aplicação deste método seria necessário conhecer a EAR do nutriente e a distribuição da ingestão habitual no grupo (Instituto of Medicine, 2003) e seria necessário um mínimo de dois dias de avaliação da ingestão individualmente para calcular a variabilidade individual. Foi utilizado como descrito anteriormente o QFA, que está validado, e que reduz um pouco a variabilidade quando comparado a outro método de avaliação de consumo, além de que a nossa população foi composta por um grande número de atletas de outras nacionalidades. O risco que se associa ao utilizar a RDA como padrão de referência para um grupo é que podemos sobrestimar a proporção do grupo que poderia ter um risco de inadequação (Slater, Marchioni, & Fisberg, 2004). O cuidado que se deve ter nestes casos é quando a média da ingestão seja superior ao valor da RDA, contudo, como para os atletas submetidos a exercícios exaustivos por tempo prolongado, não existe uma RDA específica para este tipo de atividade, seria muito casual encontrar toxicidade em algum micronutriente por excesso, devido às altas demandas metabólicas a que estes indivíduos estão submetidos. Por outro lado, no que a prevalência de

inadequação pode resultar é realmente num déficit de alguns nutrientes que são necessários para o adequado funcionamento metabólico.

Em relação à prevalência de inadequação na ingestão de micronutrientes na população em estudo, apresentada na Tabela 6, alguns nutrientes apresentam realmente valores médios de ingestão bastante baixos, como é o caso da Vitamina D, com um consumo de aproximadamente 27,3% da DRI, sendo este um dos nutrientes normalmente negligenciados que realmente tem um papel muito importante no desempenho desportivo (H. Shin *et al.*, 2014). As mulheres apresentaram valores inferiores aos homens (16,0% e 29,3%, respetivamente). Os atletas que terminaram todas as etapas tiveram valores inferiores aos que não completaram todas as etapas da prova. Igualmente para a Vitamina K, que apresenta somente uma ingestão de 15,7% do desejável, os homens tiveram valores inferiores ao das mulheres (15,8% *versus* 28,3%), e valores mais baixos naqueles que completaram todas as etapas (14,9% *versus* 22,8%) (Johnson, 2005). A Biotina que apesar de ser uma vitamina solúvel e de fácil obtenção na alimentação quotidiana, apresenta um consumo de somente 33,6 % do recomendado; com valores inferiores para as mulheres e para o grupo que completou as nove etapas.

Entre os minerais, os que apresentaram maior prevalência de inadequação foi o Cobre com valores de 0,2% da DRI e o Molibdénio com 18% da DRI, contudo sem diferenças significativas. Encontramos, no entanto, valores significativos somente para alguns micronutrientes nomeadamente para o Retinol com 72,7% da DRI e $P=0,020$, o Manganês $P=0,072$, o Cloro com 259,7% da DRI e $P=0,078$, o Iodo com 48,2% da DRI e $P=0,045$ e alguma tendência para a Vitamina B12 (370,0%) $P=0,055$ da DRI, para o grupo de homens e mulheres. O Cloro apresenta-se com um valor excessivo da DRI, provavelmente devido ao excesso no uso das bebidas isotónicas.

O Cálcio apresenta-se com valores que oscilam entre 70 e 90% (H. Shin *et al.*, 2014). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos separados por etapas.

Tabla 5: Ingestão diária de energia, macronutrientes e constituintes de interesse nos atletas da TransPortugal de acordo com as etapas concluídas.

	Total (n=55)	DRI	9 etapas	< 9 etapas	Mulheres (n=4)	Homens (n=51)
Energia (kcal)	2597,5	2500-8000*	2488,7 (1992-2952,7)	2060,6 (1843,1-2947,0)	2081,8 (2001,7-2707,9)	2122,4 (1843,1-2946,6)
Proteína (g/Kg/d)	1,3 (1,0-1,8)	1,5-2,0*				
(g/d) (%)	(113,2) 17,6	10-35**	109,4 (92,8-135,9)	88,1 (73,3-131,5)	76,1 (69,8-106,0)	98,9 (74,6-136,0)
HC (g/Kg/dia)	3,5 (2,6-4,7)	8-12*				
(g/d) (%)	(286,8) 44,4	45-65**	265,6 (195,5-308,8)	271,9 (184,0-340,2)	284,6 (243,8-285,2)	267,7 (192,4-333,1)
Gordura total (g/Kg/d)	1,2 (0,8-1,8)	0,5-1,0*				
(g/d) (%)	(109,7) 38,0	20-35**	106,4 (83,4-129,4)	88,0 (70,9-114,5)	90,7 (81,1-139,5)	89,6 (70,3-115,7)
Etanol (g)		-	5,1 (0,8-18,2)	7,5 (4,3-14,4)	12,4 (8,7-15,8)	6,3 (2,5-14,3)
Água total (L)	1,5 (1,2-1,8)	2,7-3,7*	1705,2 (1288,9-1905,9)	1428,4 (1148,8-1818,2)	1721,6 (1592,8-1957,8)	1406,3 (1183,1-1818,2)
Gordura S. (g)	24,1 (18,8-32,7)	20 (<7%)	24,6 (22,1-33,9)	24,1 (17,9-32,7)	22,3 (18,4-28,1)	24,6 (18,8-32,7)
Gordura M. (g)	43,9 (33,0-55,9)	58 (20%)	49,7 (31,0-58,8)	43,6 (32,2-49,7)	45,9 (40,3-67,4)	43,8 (31,9-55,9)
Gordura P. (g)	16,4 (12,1-22,0)	29 (<10%)	17,2 (10,8-25,0)	16,2 (12,4-21,1)	16,2 (16,2-34,8)	16,6 (11,8-22,0)
Colesterol (mg)	337,1 (281,0-433,1)	300*	346,5 (286,5-424,4)	328,7 (276,5-442,9)	329,0 (243,0-373,2)	338,8 (281,0-442,3)
Ómega-3 (g)	1,4 (1,1-2,1)	1,1-1,6*	1,7 (1,4-2,1)	1,3 (1,1-2,0)	1,1 (0,9-1,8)	1,4 (1,1-2,1)
Ómega-6 (g)	13,9 (8,9-17,9)	12-17*	14,1 (8,2-20,9)	13,7 (9,5-17,1)	14,4 (13,5-32,0)	13,7 (8,6-17,9)
Fibra alimentar (g)	27,8 (19,3-40,5)	25-38*	28,9 (23,1-46,5)	26,1 (19,3-36,6)	32,5 (30,3-43,5)	26,3 (18,8-40,5)
Metionina (g)	2,1 (1,5-2,6)	-	2,3 (1,5-2,8)	1,9 (1,5-2,5)	1,6 (1,4-2,1)	2,2 (1,5-2,6)
Arginina (g)	5,3 (4,1-7,4)	-	5,7 (4,8-9,3)	5,3 (4,1-7,1)	6,3 (4,7-7,9)	5,3 (4,1-7,4)
Aspartato (g)	8,1 (6,2-11,6)	-	8,9 (7,5-12,1)	7,7 (6,1-10,8)	8,3 (6,9-11,2)	8,1 (6,2-11,6)
Histidina (g)	2,7 (1,9-3,4)	-	3,0 (2,3-3,7)	2,4 (1,9-3,2)	2,0 (1,8-2,9)	2,8 (1,9-3,4)
Leucina (g)	7,3 (5,4-9,3)	-	7,9 (6,8-9,8)	6,4 (5,3-8,7)	5,4 (4,9-7,6)	7,4 (5,5-9,3)
Isoleucina (g)	4,2 (3,2-5,6)	-	4,6 (3,2-5,8)	3,9 (3,1-5,2)	3,3 (2,9-4,6)	4,3 (3,2-5,6)
Valina (g)	5,4 (3,9-7,2)	-	5,8 (4,7-7,8)	4,7 (3,8-6,7)	3,9 (3,6-5,7)	5,2 (3,9-7,3)
Fenilalanina (g)	4,0 (3,2-5,4)	-	4,4 (3,7-5,6)	3,6 (3,1-4,9)	3,3 (3,0-4,7)	4,1 (3,2-5,4)
Triptofano (g)	1,1 (0,8-1,5)	-	1,2 (0,9-1,5)	1,0 (0,8-1,3)	0,9 (0,8-1,2)	1,0 (0,8-1,4)
Tirosina (g)	3,2 (2,5-4,1)	-	3,6 (3,0-4,4)	2,9 (2,4-3,9)	2,5 (2,3-3,5)	3,3 (2,5-4,1)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil; DRI). Ingestão diária recomendada; Resultados são apresentados como mediana (intervalo de interquartil) de acordo com a distribuição da normalidade; d, dia; HC, Hidratos de carbono; Gordura S., Gordura saturada; Gordura M., Gordura monoinsaturada; Gordura P., Gordura Polinsaturada; EPA, Ácido eicosapentaenóico; DHA, ácido docosa-hexaenóico; AI, Adequate Intake; AMRD, Acceptable Macronutrient Distribution Range; *, **, AMRD.

Tabela 6: Prevalência de inadequação de ingestão de micronutrientes (vitaminas) nos atletas da TransPortugal.

µNutrientes	Total (n=51)	Género (GE)	DRI	9 etapas	< 9 etapas	Mulheres (n=4)	Homens (n=51)
Retinol, µg	654,0 (359,5-1303,7)	H, M (>30)	900*	606,9 (278,0-861,3) (67,4%)	768,1 (512,5-1427,4)	200,6 (174,3-228,5)	665,0 (453,8-1409,0)
Carot., µg	1248,0 (761,0-1905,8)	H, M (>30)	700*	1179,4 (783,7-1665,7)	1820,0 (627,6-2479,8)	2160,6 (2009,2-2691,1)	1179,4 (718,0-1786,9)
Tiamina, mg	1,7 (1,3-2,3) (154,5%)	H (>30)	1,1*	1,5 (1,2-2,4)	2,0 (1,5-2,3)	1,6 (1,4-1,8)	1,8 (1,3-2,4) (163,6%)
Riboflavina, mg	2,2 (1,8-3,0) (169,2%)	M (>30)	1,2*	2,1 (1,6-3,0)	2,5 (2,2-3,0)	1,6 (1,5-2,0)	2,3 (1,9-3,0) (176,9%)
Niacina, mg	25,8 (19,2-34,2) (161,2%)	M (>30)	1,1*	24,3 (17,5-33,2)	31,5 (21,2-35,5)	24,4 (20,9-29,5)	25,9 (19,2-34,8) (161,9%)
Vit. B6, mg	2,4 (1,8-3,4) (184,6%)	M (>30)	1,4*	2,3 (1,6-3,3)	2,8 (2,1-3,8)	2,6 (2,1-2,9)	2,4 (1,8-3,4) (160,0%)
Vit. B12, mg	8,9 (6,1-15,7)	A (>30)	2,4*	8,2 (4,9-14,5)	11,5 (8,0-26,7)	3,3 (3,1-6,0)	10,2 (6,1-16,2)
Folatos, µg	420,0 (296,8-571,2)	A (>30)	400*	415,6 (263,1-554,1) (104,0%)	551,6 (312,3-648,5)	433,4 (391,1-659,9)	419,9 (286,2-571,2)
AP, mg	4,9 (4,0-7,2)	A (>30)	5**	4,5 (4,0-6,9)	6,0 (4,4-7,5)	5,1 (4,6-6,6)	4,8 (3,9-7,3)
Vit. C (mg)	174,7 (118,5-242,1) (194,0%)	H (>30)	90*	167,6 (115,6-242,5)	172,3 (128,4-242,9)	237,8 (199,2-248,2)	170,9 (115,6-242,1) (189,9%)
Vit. D, µg	4,1 (3,0-6,0) (27,3%)	M (>30)	75*	3,9 (2,8-5,4)	4,9 (3,3-7,3)	2,4 (2,1-3,7)	4,4 (3,0-6,4) (29,3%)
Vit. E, mg	12,1 (8,7-17,4)	A (>30)	20*	12,1 (8,8-15,5)	13,1 (7,2-19,6)	13,9 (13,5-25,0)	11,5 (8,7-17,4)
Vit. K, µg	18,9 (12,5-23,7) (15,7%)	H (>30)	12**	17,9 (12,1-25,7)	19,0 (14,3-21,0)	25,7 (18,7-27,9)	18,9 (12,5-23,5) (15,8%)
Biotina, µg	10,1 (7,2-12,0)	M (>30)	90**	8,5 (7,1-12,4)	10,8 (10,1-11,4)	8,5 (7,4-9,6)	10,2 (7,2-12,2)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) de acordo com a teste da normalidade; Valor P calculado usando comparação de médias entre grupos com o teste de Mann-Whitney; GE, grupo etário (anos); DRI, *Dietary reference intake*; A, Adultos; M, mulheres; H, Homens; Vit., vitamina; a, Mulheres versus Homens, P=0,020; b, Mulheres versus Homens, P=0,05

Tabela 7: Prevalência de inadequação de ingestão de micronutrientes (minerais) nos atletas da TransPortugal.

μNutrientes	Total (n=51)	Gênero (GE)	DRI	9 etapas	< 9 etapas	Mulheres (n=4)	Homens (n=51)
Ca, mg	940,0 (735,6-1115,2) (94,0%)	A (31-50) M (>50)	1000* 1200*	835,4 (707,3-1115,2) (83,5%)	972,1 (940,0-1171,6) (97,2%)	842,7 (658,0-958,3) (84,3%)	947,7 (735,6-1144,2) (94,8%)
Cu, mg	2,2 (1,5-3,3)	A (>30)	900*	2,0 (1,5-3,0)	2,8 (1,5-3,8)	2,6 (2,3-3,4)	2,1 (1,5-3,3)
Fe, mg	17,1 (12,3-23,0) (213,7%)	H (>30) M (31-50)	8* 18*	16,9 (11,4-22,3) (211,2%)	18,2 (15,0-24,3) (227,5%)	16,6 (13,9-20,4) (92,2%)	17,1 (12,3-22,9) (213,8%)
Mg, mg	406,2 (327,0-563,1) (96,7%)	H (>30) M (>30)	420* 320*	396,1 (327,0-531,4) (94,3%)	440,3 (357,5-679,3) (104,7%)	446,5 (428,9-637,2) (139,5%)	389,6 (319,8-563,1) (92,8%)
Mn, μg	4,5 (3,5-6,2) (195,6%)	H (>30) M (>30)	2,3** 1,8**	4,3 (3,5-6,0) (187,0%)	5,1 (3,5-6,4) (221,7%)	6,1 (6,0-7,9) (338,9%)	4,4 (3,5-6,1) (336,7%) ^a
P, mg	1563,3 (1204,4-2014,7) (2233%)	A (>30)	700	1415,4 (1184,3-2148,0) (202,2%)	1815,7 (1376,5-2008,7) (259,4%)	1229,3 (1177,1-1700,4)	1563,3 (1204,4-2014,7)
K, mg	3694,3 (2768,3-5281,7) (78,6%)	A (>30)	4,7**	3549,7 (2729,3-4915,2) (75,5%)	4020,5 (3105,6-5663,4) (85,5%)	4142,5 (3773,7-5040,0)	3589,2 (2729,3-5281,7)
Se, μg	112,5 (84,8-138,0) (204,5%)	A (>30)	55*	110,8 (81,8-138,0) (201,5%)	120,9 (99,3-149,4) (220%)	86,0 (67,3-92,6)	118,1 (84,8-140,2)
Na, mg	2030,2 (1329,1-2568,2) (135%)	A (31-50)	1,5*	1987,4 (1301,0-2504,2) (132,5%)	2462,2 (1775,8-2647,8) (164,1%)	1309,7 (1285,4-1542,8)	2085,0 (1374,0-2616,2)
Zn, mg	13,1 (10,0-17,4) (119,1%)	H (>30) M (>30)	11* 8*	12,5 (10,0-17,4) (114,0%)	16,0 (12,3-19,7) (145,5%)	10,7 (9,9-15,3) (133,8%)	13,5 (10,0-17,4) (122,7%)
Cl, mg	519,4 (447,1-676,2) (259,7%)	A (31-50)	2,3**	519,2 (428,5-662,6) (255,8%)	597,7 (463,3-706,4) (294,4%)	436,9 (379,1-450,1)	530,0 (457,0-696,3)
I, μg	72,3 (41,6-93,2)	A (>30)	150*	71,6 (44,1-94,4)	77,9 (40,4-90,4)	32,6 (20,3-44,6)	73,4 (44,1-94,4)
Mb, μg	8,1 (6,1-10,1)	A (>30)	45*	8,4 (5,8-11,2) (18,7%)	8,3 (6,8-9,2) (18,4%)	9,0 (7,2-10,1)	8,1 (6,1-10,1)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) de acordo com a teste da normalidade; Valor P calculado usando comparação de médias entre grupos com o teste de Mann-Whitney; GE, grupo etário (anos); DRI, Dietary reference intake; A, Adultos; M, mulheres; H, Homens; Cu, Cobre; Fe, Ferro; Mg, Magnésio; Mn, Manganês; P, Fósforo; K, Potássio; Se, Selênio; Na, Sódio; Zn, Zinco; Cl, Cloro; I, Iodo; Mb, molibedênio; a, Mulheres versus Homens, P=0,072; b, Mulheres versus Homens, P=0,078; c, Mulheres versus Homens, P=0,045.

4.1.3.3. PREPARAÇÃO FÍSICA

Em relação ao tempo dedicado ao treino específico para a realização desta prova, e segundo informação obtida de 23 dos atletas, verificou-se que em média apresentavam um tempo de treino muito semelhante, pelo menos nos últimos dois meses (dados não apresentados). O treino é bastante semelhante nos meses anteriores à prova, normalmente os ciclistas treinam de 9 a 12 meses para a prova específica, com um aumento substancial no volume de treino durante os últimos dois meses que antecedem a prova, e distribuem-se em três grupos; os que treinam até 10 horas/semana, outros que treinam entre 10 e 15h/semana, e os que treinam mais de 16h/semana, com valores mínimos e máximos de 6 horas a 25 horas/semana, respetivamente. No entanto, não se observam diferenças significativas entre o tempo de treino e a velocidade de chegada, nem em relação à conclusão ou não das nove etapas.

4.2. IMPACTO IMUNE E INFLAMATÓRIO

4.2.1. IMPACTO DA ULTRAMARATONA DE CICLISMO DE MONTANHA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E O CATABOLISMO DA HEMOGLOBINA

O exercício físico cumulativo extenuante, como a ultramaratona de ciclismo de montanha da TransPortugal, é representativo do exercício extremo, que pode expor o organismo a um stress significativo e expandir os limites da capacidade fisiológica adaptativa e plástica do ser humano. O exercício foi realizado por longos períodos de tempo, por nove dias consecutivos com descanso mínimo e com efeitos cumulativos de fadiga. Além do trauma local e sistémico, os indivíduos foram submetidos a condições climáticas e de terreno adversas. Os atletas que participaram da ultramaratona do ciclismo TransPortugal não eram profissionais, portanto, embora exercendo frequentemente esta atividade, é improvável que atinjam o nível de preparação fisiológica e metabólica que os atletas de elite podem ter.

Nesta parte serão realçados os efeitos do exercício extenuante e acumulativo a longo prazo em relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos da inflamação. Simultaneamente, estudaram-se alguns fatores de variação genética responsáveis pela variabilidade interindividual. Um especial interesse foi dedicado à via de regulação do catabolismo da hemoglobina. Os dados de repouso e pós-exercício, bem como o ganho (% de variação) ajustados para a variação do volume plasmático, estão descritos na Tabela 8 para os marcadores hematológicos e inflamatórios.

Tanto no início como no final da prova e de acordo com a contagem das células hematológicas, os atletas apresentavam valores clinicamente normais. Contudo, a contagem de células do sangue periférico demonstrou variações importantes em associação com este esforço extremo. A fração dos leucócitos totais aumentou à custa da contagem de neutrófilos e monócitos (em 70% e 61%, respetivamente) ($P=0,0001$ e $P<0,0001$) (Tabela 8). A contagem de eritrócitos e a concentração de hemoglobina aumentaram significativamente, 2,1% e 3,4%, respetivamente ($P<0,0001$) (Tabela 8).

Tabela 8: Marcadores hematológicos e metabólicos antes da corrida, pós-corrida e de acordo com a magnitude de efeito durante a ultramaratona de ciclismo TransPortugal.

9-dias de ultramaratona de ciclismo				
	Pré-corrida (n=55)	Pós-corrida corrigido (n=50)	P	Δ% (n=50)
Leucócitos, n.10 ⁹ /L	5,9 (4,9-5,9)	7,9 (6,2-9,7)	<0,0001 [†]	+ 38,1 ± 5,4
Linfócitos, n.10 ⁹ /L	1,7 (1,4-2,0)	1,6 (1,4-2,0)	0,484 [†]	+ 3,0 ± 5,5
Neutrófilos, n.10 ⁹ /L	3,7 (2,8-4,6)	5,9 (4,3-7,0)	0,0001 [†]	+ 70,2 ± 12,6
Monócitos, n.10 ⁹ /L	0,3 (0,2-0,3)	0,4 (0,4-0,5)	<0,0001 [†]	+ 61,4 ± 10,6
Eritrócitos, n.10 ¹² /L	4,7 ± 0,04	4,8 ± 0,1	0,003 [*]	+ 2,1 ± 0,7
Hemoglobina, g/dL	14,3 ± 0,1	14,9 ± 0,2	<0,0001 [*]	+ 3,4 ± 0,7
RDW	12,8 ± 0,4	15,3 ± 0,3	<0,0001 [*]	+ 19,0 ± 2,1
Bilirrubina total, mg/dL ⁻¹	0,3 (0,2-0,5)	0,3 (0,2-0,6)	0,237 [†]	+ 22,9 ± 9,4
ALT, U/L	22,0 (18,0-27,5)	47,0 (36,8-66,5)	<0,0001 [†]	+ 181,2 ± 31,6
AST, U/L	240 (20,0-28,0)	47,6 (36,7-60,3)	<0,0001 [†]	+ 138,5 ± 21,1
GGT, U/L	16,0 (12,0-22,5)	23,5 (17,2-41,3)	<0,0001 [†]	+ 117,9 ± 28,9
hs-CRP, mg/dL ⁻¹	0,01 (0,004-0,05)	0,9 (0,3-2,1)	<0,0001 [†]	+ 13 067,5 ± 2394,4
Colesterol Total, mg/dL ⁻¹	182,0 (161,5-212,0)	174,2 (149,6-220,1)	0,175 [†]	- 1,5 ± 2,0
Haptoglobina, mg/dL ⁻¹	99,9 ± 5,7	155,5 ± 7,9	<0,0001 [*]	+ 72,2 ± 13,7
sCD163, ng/mL ⁻¹	540,7 (384,8-633,1)	534,2 (355,9-607,8)	0,710 [†]	+ 1,2 ± 3,3

Os dados são apresentados como médias ± SEM ou mediana (intervalo interquartil) de acordo com o teste da normalidade; Valores de P obtidos segundo a comparação entre o pré e pós-corrida usando * medidas repetidas t-test ou † teste de Wilcoxon; Pós-corrida corrigido para o volume plasmático = Pós-corrida sem correção x (1 + Δ Volume plasmático (%)/ 100)]; RDW, amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; ALT, Alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gama-glutamilttransferase; Hs-CRP, proteína C reativa de alta sensibilidade; SCD163, recetor solúvel para a haptoglobina.

Tal como observado recentemente em corredores de ultramaratona (Chiu *et al.*, 2015), a ultramaratona de ciclismo de montanha com um perfil de longo prazo implica modificações consideráveis em todo o organismo devido ao impacto frequente em superfícies duras, especialmente nos membros inferiores, coluna e braços, capazes de induzir hemólise. A hemólise intravascular associada ao exercício, principalmente de glóbulos vermelhos senescentes, parece estar relacionada com o stress mecânico sobre os glóbulos vermelhos que passam através de capilares na contração muscular e pelo impacto com as superfícies duras (Arakawa *et al.*, 2016). Por conseguinte, foi relatado que exercícios consecutivos e extenuantes provocam anemia (Shin, Park, Ahn, Park, & Kim, 2016), embora o impacto do esforço altamente exigente, realizado repetidamente por nove dias consecutivos com pouco repouso e fadiga cumulativa, ainda não seja amplamente conhecido no que concerne à anemia e aos marcadores de catabolismo de hemoglobina.

O perfil do tipo de exercício da TransPortugal revelou o aumento significativo no RDW e níveis de hemoglobina, sendo, simultaneamente, observadas diminuições na

contagem de eritrócitos nos atletas que não completaram todas as etapas. A natureza repetitiva e cumulativa do exercício extenuante nesta prova poderá contribuir para o aumento da hemólise e do subsequente catabolismo da hemoglobina, não permitindo que a eritropoiese restabeleça a contagem dos glóbulos vermelhos nem a maturação adequada dos mesmos. A variação na concentração de hemoglobina e contagem de eritrócitos, em conjunto com um aumento da Hp em circulação, após a corrida TransPortugal, provavelmente refletem o mecanismo adaptativo da Hp para o sequestro de hemoglobina tóxica libertada por lesão dos eritrócitos. De facto, a hemólise foi mais pronunciada em atletas expostos a um aumento do nível de stress (Mairbäurl, 2013).

A imunoinflamação é um processo fisiológico necessário, que está associado ao exercício físico e contribui para reparar os tecidos danificados relacionados com o exercício, quando a homeostase é viável (Comassi *et al.*, 2015). Um exercício exaustivo e repetitivo de longa duração implica uma carga cumulativa com impacto potencial nos processos reguladores imunoinflamatórios, sendo a ultramaratona de ciclismo TransPortugal representativa de um tipo de exercício tão exigente. A contagem total de leucócitos no sangue periférico aumentou à custa dos neutrófilos e monócitos, enquanto a subpopulação de linfócitos diminuiu de forma importante. Estes dados estão de acordo com os efeitos estabelecidos do exercício extenuante em subpopulações de leucócitos após o exercício (B. K. Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Além disso, o grupo de atletas que completaram as nove etapas apresentaram um maior aumento da contagem de neutrófilos, o que pode refletir o excesso de carga a que foram submetidos em relação ao outro grupo de atletas (< 9 etapas). Portanto, nestes desafios exaustivos, parece haver uma correlação entre a intensidade do desempenho e as células circulantes da linha branca, sugerindo a mobilização precoce dessas células em resposta ao exercício. Notavelmente, não houve distúrbio na resposta e mobilização de leucócitos, mesmo após um esforço extenuante repetitivo de nove dias, onde uma depleção cumulativa era plausível. De facto, episódios agudos de exercício intensivo induzem uma resposta pró-inflamatória com linfocitopenia transitória e neutrofilia mediada por apoptose acelerada, enquanto o treino regular se revelou importante para o aumento da função imunológica (Kruger & Mooren, 2014).

Dado que os participantes na TransPortugal treinaram vários meses antes da corrida, apesar de não serem profissionais, estes resultados sugerem que este exercício fisicamente exigente e cumulativo está associado a pequenos distúrbios imunológicos para os leucócitos.

O exercício persistente e exigente parece estar também associado à hemólise extravascular, por modificação do ambiente oxidativo no baço e no fígado devido ao ferro livre e descompartimentado libertado pela hemólise (Kobayashi *et al.*, 2014). Os níveis circulatórios de transaminases hepáticas aumentaram significativamente (181,2% para ALT e 138% para AST, $P < 0,0001$). Os níveis totais de bilirrubina e colesterol foram comparáveis entre as medidas basais e pós-corrida. Na realidade, apesar da não especificidade do AST e da lesão muscular associada ao exercício, com subsequente libertação da enzima para a corrente sanguínea, os participantes da corrida TransPortugal apresentaram atividades ALT e GGT concomitantemente elevadas após a corrida, identificando o fígado como fonte primária destas enzimas (De Paz, Villa, Lopez, & Gonzalez-Gallego, 1995; Shin *et al.*, 2016), sugerindo assim pelo menos menor stress hepático.

Outros parâmetros inflamatórios também estiveram modificados em resposta ao exercício exaustivo, a PCR aumentou cerca de treze mil por cento ($P < 0,0001$), enquanto a Hp e o seu recetor CD163 solúvel se comportam de forma diferente com o exercício extenuante; enquanto a Hp aumentou 72,2% ($P < 0,0001$) e o CD163 variou 1,2% de pré para pós-corrida ($P = 0,710$) (Tabela 8).

A proteína CD163 solúvel é um recetor específico dos macrófagos para o complexo de haptoglobina-hemoglobina, conhecido por proteger da lesão tecidual por eliminação de subprodutos induzidos pelo stress oxidativo da hemoglobina (Buehler *et al.*, 2009; Moller, 2012). Apenas um pequeno estudo ($n = 8$) em corredores revelou aumento dos níveis de sCD163 após o exercício extenuante, como a maratona ou meia maratona (Niemela, Kangastupa, Niemela, Bloigu, & Juvonen, 2016). Na ultramaratona de ciclismo de nove dias, verificou-se uma diminuição não significativa de sCD163, antes e após a prova, apesar de a Hp sérica ter aumentado. O recetor do complexo Hp-Hb, sCD163, geralmente é libertado para o sangue periférico para mediar a resposta imune inata da apropriação do ferro ligado à hemoglobina. O sCD163 inalterado, juntamente

com níveis mais altos de Hp e a diminuição da hemoglobina no final desse esforço cumulativo, pode refletir os efeitos contrarregulatórios e protetores para os efeitos inflamatórios, oxidativos e hemolíticos do exercício extenuante, provavelmente mediados pelo recrutamento de macrófagos monocíticos para lidar com as lesões músculo-esqueléticas. De acordo com isto, outros trabalhos fazem referência a uma maior função de eliminação do complexo Hp-Hb por populações de macrófagos em associação com a diminuição da disponibilidade de sCD163, devido à internalização endocítica e à reciclagem lenta. As diferenças em sCD163 que observamos em comparação com Niemelä *et al.* provavelmente revelam o efeito cumulativo do exercício físico altamente exigente (Bode, Albrecht, Haussinger, Heinrich, & Schaper, 2012).

De acordo com a análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em relação às etapas da TransPortugal realizadas, em ambos os momentos da corrida e em relação à magnitude do efeito para cada parâmetro, verificaram-se diferenças significativas na contagem de eritrócitos e linfócitos entre os grupos (Tabela 9).

No final desta árdua ultramaratona de ciclismo de montanha, os atletas que completaram as nove etapas em relação aos que não completaram todas as etapas apresentaram uma contagem superior de leucócitos e neutrófilos ($P=0,022$), neutrófilos ($P=0,018$), uma contagem de eritrócitos ($P=0,004$) e uma concentração superior de hemoglobina ($P=0,004$), colesterol ($P=0,001$) e bilirrubina total ($P=0,002$). De facto, o impacto da ultramaratona de ciclismo na contagem de eritrócitos, hemoglobina e RDW foi notável nos finalizadores das nove etapas, que foram submetidos a maiores cargas de exercícios, em comparação aos outros atletas, sendo concordante com o quadro de hemólise anteriormente referido. Os atletas finalizadores de todas as nove etapas apresentaram, também, níveis significativamente mais baixos dos marcadores inflamatórios PCR e Hp, em comparação com participantes com menos de nove etapas completas ($P=0,048$ e $P=0,007$, respetivamente) (Tabela 9). Além disso, o grupo dos atletas com nove etapas evidenciou níveis superiores de ganho de leucócitos ($P=0,013$) e neutrófilos ($P=0,004$), colesterol total ($P=0,023$) e bilirrubina total ($P=0,010$). O impacto desta ultramaratona de ciclismo na contagem de glóbulos vermelhos aumentou mais acentuadamente neste grupo, para a contagem de

eritrócitos ($P=0,015$), concentração de hemoglobina ($P=0,015$) e RDW ($P=0,007$). Por outro lado, a Hp aumentou menos para os atletas do grupo que terminaram todas as etapas em relação ao outro grupo ($P=0,014$) (Tabela 9).

A análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos não revelou diferenças de acordo com a velocidade média para completar a TransPortugal para os atletas com as nove etapas (dados não mostrados).

Tabela 9: Comparação entre os atletas que terminaram todas as nove etapas (n=37) e os que não conseguiram completar todas as etapas (n=13) da prova da TransPortugal.

	Pré-corrida			Pós-corrida			Δ%		P *
	< 9 Etapas (n=16)	9 Etapas (n=38)	P	< 9 Etapas (n=13)	9 Etapas (n=37)	P	< 9 Etapas (n=13)	9 Etapas (n=37)	
Leucócitos, n.10 ⁹ /L	5,6 (4,9 a 7,4)	5,9 (5,0 a 6,8)	0,719†	6,9±0,7	8,6±0,3	0,022*	+ 15,9±10,1	+ 45,9±5,9	0,013*
Linfócitos, n.10 ⁹ /L	1,5 (1,3 a 1,7)	1,7 (2,4 a 2,0)	0,015†	1,6±0,2	1,7±0,1	0,683*	+ 0,6 (-15,6 a 15,1)	- 5,2 (-14,8 a 12,8)	0,666†
Neutrófilos, n.10 ⁹ /L	3,7 (2,9 a 5,3)	3,6 (2,8 a 4,4)	0,483†	4,7±0,6	6,3±0,3	0,018*	+ 14,4 (-23,9 a 50,4)	+ 72,8 (38,1 a 110,8)	0,004†
Monócitos, n.10 ⁹ /L	0,3 (0,3 a 0,4)	0,3 (0,2 a 0,3)	0,839†	0,5±0,04	0,5±0,03	0,679*	+ 44,4 (14,4 a 84,7)	+ 32,7 (13,3 a 73,8)	0,782†
Eritrócitos, n.10 ¹² /L	4,6±0,1	4,8±0,04	0,013*	4,5±0,1	5,0±0,1	0,004*	- 0,8±1,4	+ 3,2±0,8	0,015*
Hemoglobina, g/dL	13,9±0,2	14,5±0,1	0,013*	14,1±0,3	15,2±0,2	0,004*	+ 1,6±0,9	+ 5,3±0,8	0,015*
RDW	12,8±0,1	12,8±0,1	0,609*	14,3 (13,0 a 14,8)	15,6 (14,7 a 16,6)	0,004†	+ 10,3 (3,2 a 14,1)	+ 19,1 (12,5 a 29,5)	0,007†
ALT, U/L	21,0 (33,3 a 63,0)	22,0 (35,0 a 61,0)	0,805†	48,0 (36,6 a 65,8)	46,5 (39,0 a 70,4)	0,715†	+ 95,1 (53,5 a 167,2)	+ 111,2 (57,9 a 235,8)	0,407†
AST, U/L	24,0 (20,5 a 34,5)	22,0 (19,0 a 27,0)	0,228†	40,1 (36,1 a 51,9)	47,8 (37,7 a 62,3)	0,095†	+ 52,4 (24,5 a 85,5)	+ 102,9 (71,5 a 167,4)	0,003†
GGT, U/L	17,0 (10,5 a 22,0)	15,5 (12,0 a 22,8)	0,697†	26,7 (17,6 a 50,3)	23,1 (17,2 a 30,6)	0,650†	+ 98,4 (21,4 a 233,9)	+ 42,9 (7,5 a 108,8)	0,221†
hs-PCR, mg/dL	0,01 (0,007 a 0,05)	0,01 (0,004 a 0,05)	1,000†	1,8 (0,7 a 2,1)	0,7 (0,2 a 1,6)	0,048†	+ 6622,7 (2244,1 a 29990,2)	+ 4659,0 (17884,2 a 17975,2)	0,325†
Bilirrubina Total, mg/dL	0,4 (0,3 a 0,5)	0,3 (0,2 a 0,5)	0,569†	0,3 (0,2 a 0,3)	0,4 (0,2 a 0,6)	0,002†	- 26,9 (-51,4 a 14,8)	+ 24,0 (-10,4 a 65,9)	0,010†
Colesterol-Total, mg/dL	165,0 (153,5 a 188,0)	194,0 (161,3 a 220,0)	0,114†	155,8 (136,8 a 163,5)	195,8 (159,8 a 224,3)	0,001†	- 9,0±4,4	+ 1,1±2,0	0,023*
haptoglobina, mg/dL	106,2±10,5	95,2±6,3	0,361*	190,8±11,7	143,1±9,1	0,007*	+ 81,8 (57,0 a 107,3)	+ 50,7 (40,9 a 72,2)	0,014†
sCD163, mg.dL ⁻¹	472,0 (380,1 a 621,4)	540,7 (383,8 a 652,8)	0,762†	519,8 (405,1 a 543,5)	552,9 (354,4 a 621,6)	0,682†	- 7,2 (-19,0 a 18,1)	+ 0,6 (-11,7 a 14,3)	0,765†

Os dados são apresentados como média ± SEM ou mediana (intervalo interquartil) de acordo com o teste de normalidade; Valores de P obtidos segundo a comparação entre o pré e pós-corrida usando * medidas repetidas t-test ou † teste de Wilcoxon; Pós-corrida corrigido para o volume plasmático = Pós-corrida sem correção x (1 + Δ Volume plasmático (%)/ 100)); RDW, amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; ALT, Alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gamma-glutamiltansferase; Hs-CRP, proteína C reativa de alta sensibilidade; sCD163, receptor solúvel para a haptoglobina.

4.2.2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS COM A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E CATABOLISMO DA HEMOGLOBINA

As frequências de genótipos foram analisadas nos polimorfismos funcionais conhecidos nos genes *HP* (*HP* 1.1, 0.24; *HP* 2.1, 0.42 e *HP* 2.2, 0.34) e *HMOX1* (homozigótico A 0.11; heterozigóticos 0.55; e homozigótico T 0.34). Os polimorfismos analisados não estiveram associados à conclusão das etapas nem com o tempo para completar a prova (dados não apresentados). Destacam-se as interações significativas de genótipo-fenótipo, considerando todos os atletas e apenas o grupo dos atletas com nove etapas (Figuras 10 e 11, respetivamente). Os resultados apresentados refletem modelos recessivos e dominantes para as variantes genéticas *HMOX1* e *HP*, respetivamente. O genótipo AA da *HMOX1* esteve associado a uma maior contagem de leucócitos antes da prova para todos os atletas e para os que completaram todas as etapas. Notavelmente, no grupo de atletas com nove etapas, os portadores homozigóticos A para *HMOX1* apresentaram contagens superiores de linfócitos e níveis de Hp em ambos os momentos da avaliação da prova (Figura 11). Quando todos os atletas foram incluídos na análise, o genótipo AA esteve associado apenas a uma maior contagem de linfócitos antes da prova (Figura 10).

De facto, o grupo heme libertado dos glóbulos vermelhos lisados é metabolizado em ferro, biliverdina (mais tarde para bilirrubina) e monóxido de carbono pela heme oxigenase-1. A bilirrubina produzida estimula a ativação do fator endotelial nuclear-eritroide 2 p-45 relacionado com o fator 2 (Nrf2) (Qaisiya, Coda Zabetta, Bellarosa, & Tiribelli, 2014). Esta molécula, um sensor celular de stress oxidativo, contribui ainda mais para a adaptação à hemólise, aumentando a reparação e degradação de macromoléculas danificadas e modulando o metabolismo intermediário como o que resulta do metabolismo em exercícios exigentes (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

Os níveis de bilirrubina, que também dependem da metabolização do heme pela *HMOX1*, não estiveram alterados em todos os atletas após esta ultramaratona exigente, sugerindo que o catabolismo da hemoglobina pode ser feito preferencialmente através da via de limpeza do macrófago Hp-CD163. No entanto, não podemos excluir a formação de complexos de heme-hemopexina que sinalizam

através de CD91, aumentando a expressão de IL-10 que é um indutor potente de HMOX1 (Hull, Agarwal, & George, 2014), estando aqui possivelmente associado ao aumento significativo dos níveis de pós-corrída e ganho de percentagem de bilirrubina no final da prova. O polimorfismo genético funcional na *HMOX1* no locus -413 T> A tem sido associado à proteção cardíaca durante o exercício submáximo (He *et al.*, 2008). O impacto desta variante na atividade enzimática e na função imune em participantes da corrida TransPortugal foi analisado por interações genótipo-fenótipo. De acordo com estas análises, verificou-se que o genótipo *HMOX1* AT pode estar associado a uma tentativa de proteção na medula óssea para lesões persistentes (Taha *et al.*, 2010). Realmente, o papel do *HMOX1* afeta a resposta das células da linha branca a partir do ferro libertado, armazenado como ferritina e transportado pela transferrina para a medula óssea para ser reutilizado na síntese de hemoglobina.

Para o polimorfismo da *HP*, os atletas portadores do fenótipo 2.2 apresentaram aumento de ganho em neutrófilos e níveis mais baixos de haptoglobina em ambos os momentos de avaliação (Figuras 10 e 11). Para este polimorfismo, o ganho ($\Delta\%$) nos níveis de hemoglobina e colesterol esteve aumentado somente quando todos os atletas foram analisados.

A ativação de neutrófilos durante o exercício gera espécies reativas de oxigénio (ROS), bem como o recrutamento de monócitos e macrófagos (Quaye, 2008). O fenótipo *HP* 2.2 esteve associado a níveis elevados de neutrófilos, refletindo uma menor capacidade de mitigar a potencial lesão local e sistémica pela produção de ROS. Concordante com outros estudos, observamos que biomarcadores hematológicos conhecidos, como neutrófilos e hs-PRC, aumentaram imediatamente após a prova (Kasapis & Thompson, 2005). Os estudos de associação genótipo-fenótipo corroboram o papel do polimorfismo genético da *HP*, induzindo uma resposta antioxidante mais eficiente e conseqüentemente um melhor desempenho.

Por fim, a análise da covariância mostrou o efeito significativo das variantes genéticas da *HP* nos níveis de circulação pós-corrída de Hp ($F=13,017$, $P=0,001$), controlando para a variação na hemoglobina, idade e tempo de desempenho. Para o aumento do ganho de Hp (%) como variável dependente contínua na análise ANCOVA, o efeito das variantes genéticas da *HP* permaneceu significativo ($F=5,103$,

P=0,029). Esta evidência sugere que, além do esforço físico, um efeito modulador dependente do perfil genético influencia os níveis de Hp, concordando assim com os níveis resultantes do marcador inflamatório da Hp associado ao exercício.

Neste estudo, não controlámos a ingestão de água e sódio, o que é conhecido por influenciar o volume plasmático pós-exercício, portanto, representa uma potencial limitação. Contudo, os ajustes realizados nas concentrações pós-corrída foram minimamente modificados, sugerindo que não houve variação significativa do volume de plasma pré-pós-corrída, confirmando uma boa hidratação dos atletas em toda a ultramaratona.

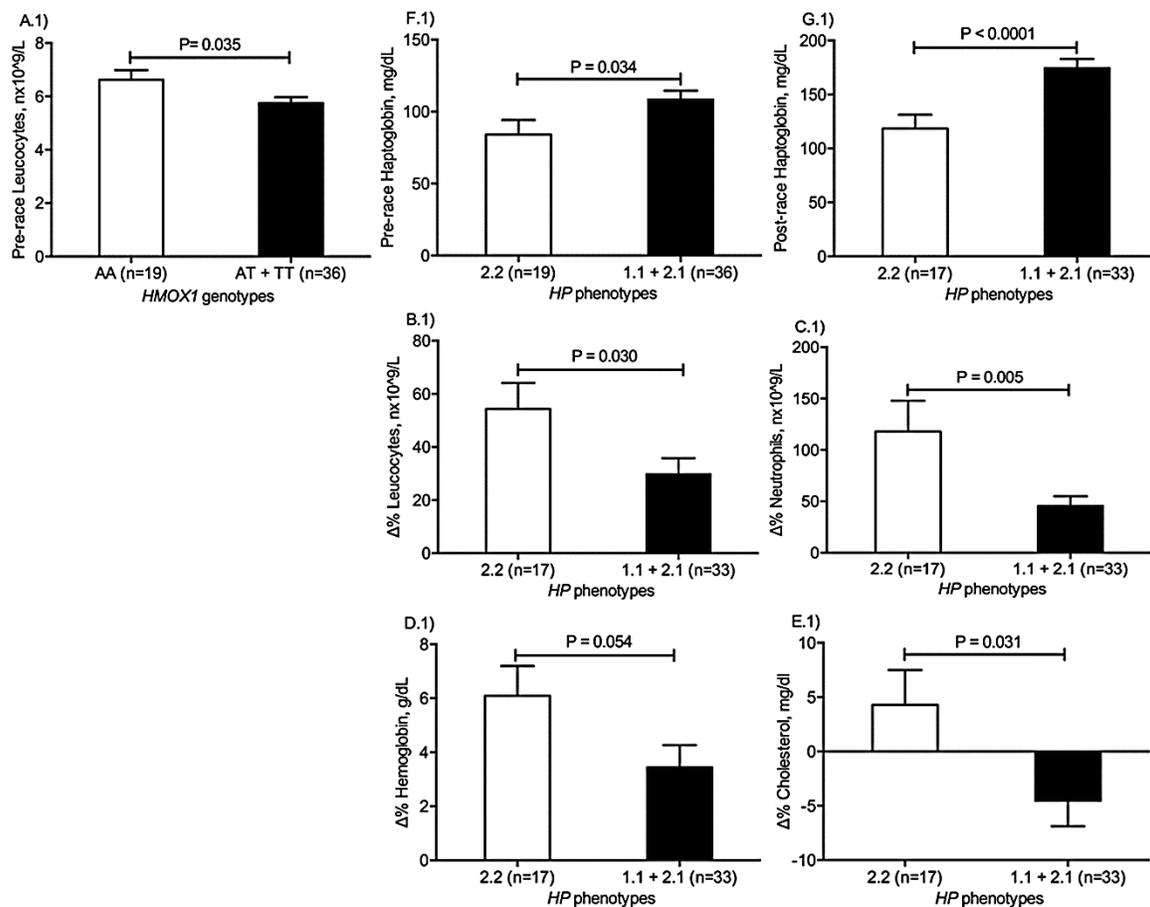


Figura 10: Parâmetros hematológicos e bioquímicos de acordo com os polimorfismos HMOX1 e HP em todos os atletas que realizaram a corrida TransPortugal. A comparação entre os valores da tendência central foi feita através de Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de Mann-Whitney, com exceção dos gráficos B.1, F.1 e G.1, com análise ANOVA seguida de testes t-student, com valores expressos como média \pm SEM.

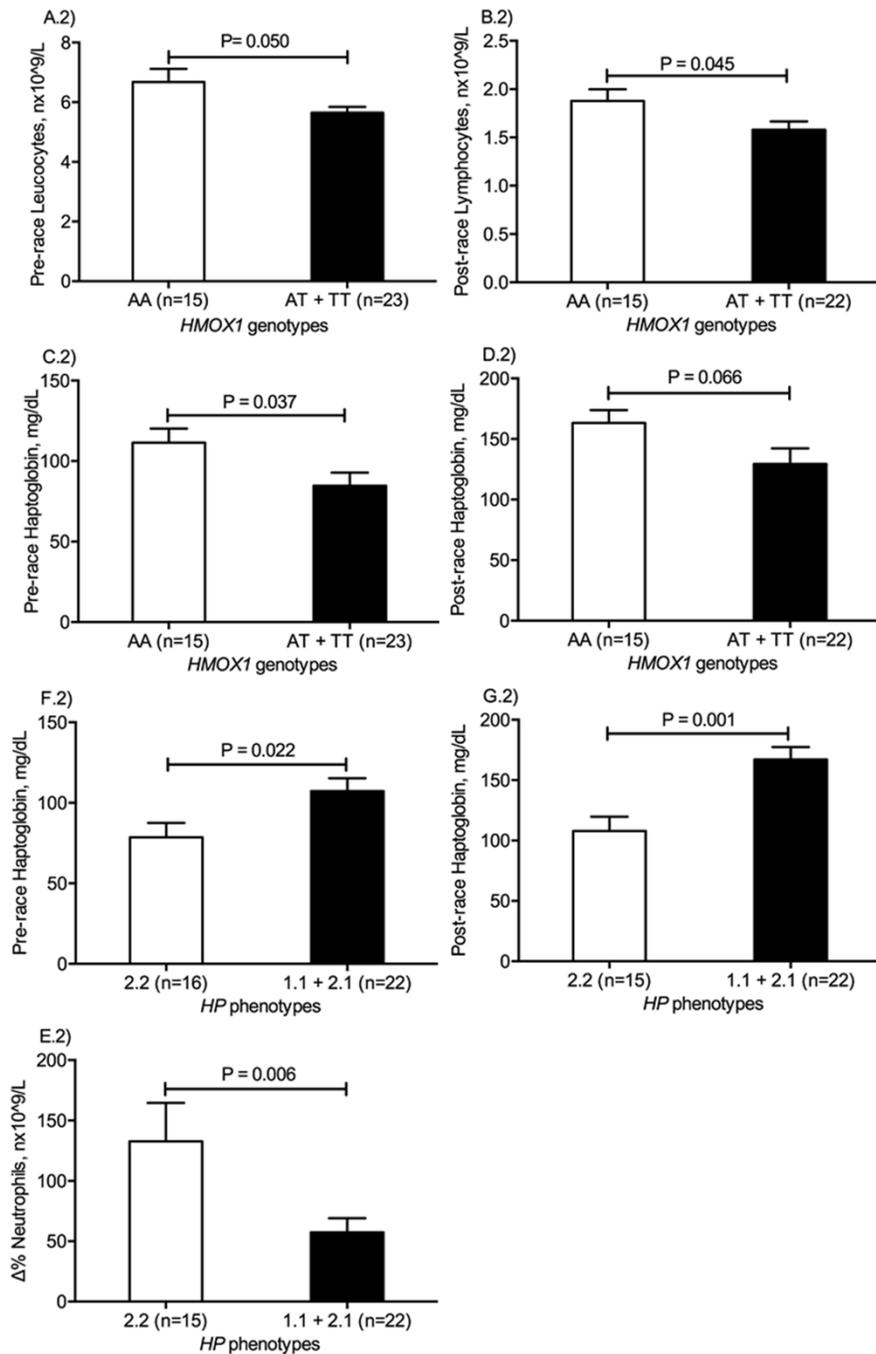


Figura 11: Comparações de parâmetros hematológicos e bioquímicos de acordo com os polimorfismos HMOX1 e HP para os atletas que completaram as nove etapas (n=37). A comparação entre os valores da tendência central foi feita através de Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de Mann-Whitney, com exceção dos gráficos B.2, C.2, D.2, F.2 e G.2, com análise ANOVA seguida de testes t-student, com valores expressos como média \pm SEM.

4.3. EIXO ENDÓCRINO DA INTERAÇÃO MÚSCULO-OSSO

A Tabela 10 mostra os dados descritivos das variáveis analisadas neste estudo. Para cada variável, a linha de base, pós-corrída corrigida para o volume do plasma e a magnitude do efeito são mostradas. A interleucina-6 (IL) aumentou em mais de 1100 por cento ($P < 0,0001$) desde a linha de base até o final da corrida (Tabela 10). Outros marcadores musculares aumentaram significativamente em 25,7% para a creatinina e em 267,9% para o ácido úrico (ambos $P < 0,0001$) (Tabela 10). Ao nível da função hepática, embora com o intervalo normal, a glicose aumentou significativamente perto de 40% ($P < 0,0001$), enquanto o HOMA diminuiu significativamente cerca de 5% ($P = 0,005$).

Tabela 10: Composição óssea e marcadores metabólicos antes da corrida, pós-corrída (corrigida para o volume de plasma e a respetiva magnitude de efeito ($\Delta\%$) na ultramaratona de ciclismo TransPortugal.

Os dados são apresentados como médias \pm SEM ou mediana (intervalo interquartil) de acordo com o teste da normalidade; Valores de P obtidos segundo a comparação entre o pré e pós-corrída usando * medidas repetidas t-test ou † teste de Wilcoxon;

9 dias ultramaratona de ciclismo				
	Pré-corrída	Pós-corrída corrigido	P	$\Delta\%$
Creatinina, mg/dL	0,9 (0,8–1,0) ^b	1,1 (1,0–13)	<0,0001 [†]	+ 25,7 \pm 4,2
Ácido úrico, mg/dL	4,5 (3,9–5,2) ^b	7,1 (5,8– 8,3)	<0,0001 [†]	+ 267,9 \pm 182,8
Glicose, mg/dL	68,0 (56,0–77,0) ^b	84,3 (69,2–101,8)	<0,0001 [†]	+ 39,4 \pm 7,3
Insulina, mU/mL	11,0 (6,7–24,3) ^b	10,3 (6,3–17,3)	0,208 [†]	+ 22,6 \pm 15,7
HOMA-IR	1,7 (1,1–3,3) ^b	1,8 (1,1–3,8)	0,746 [†]	+ 62,8 \pm 25,1
HOMA-B	64,8 (30,1–129,2) ^b	40,7 (25,6–82,6)	0,005	-5,4 \pm 14,1
Testosterona, pg/mL	7,1 (5,7–9,4) ^b	6,6 (4-9,4)	0,152 [†]	+ 1,2 \pm 6,0
Gla-OC, ng/mL	14,6 (9,2–24,3) ^b	16,9 (10,4–25,4)	0,154 [†]	+ 44,6 \pm 18,7
IL-6, pg/mL	0,3 (0,2 t-0,6) ^b	1,7 (1,2–3,3)	<0,0001 [†]	+ 1129,7 \pm 352,0

Pós-corrída corrigido para o volume plasmático = Pós-corrída sem correção $\times (1 + \Delta$ Volume plasmático (%)/ 100)]; a, Valores pós-corrída sem correção para o volume plasmático;

Em primeiro lugar, de acordo com o estado nutricional dos atletas, avaliaram-se os nutrientes que podem estar associados ao desempenho ou a interação músculo-osso que procuramos discutir. De acordo com as ingestões dietéticas de referência (DRI), a vitamina D e a vitamina K foram as que se apresentaram abaixo das recomendações desejáveis (Tabela 6); os carboidratos também foram considerados abaixo das recomendações (Tabela 5) e o cálcio já se apresenta dentro dos valores recomendados (Tabela 7).

Apesar disso, a ingestão de vitamina K foi diretamente correlacionada com a glicose pós-corrída ($r=0,346$, $P=0,027$), $\Delta\%$ de insulina ($r=0,328$, $P=0,026$), $\Delta\%$ HOMA-IR ($r=0,315$,

$P=0,033$) e $\Delta\%$ HOMA- β ($r=0,322$, $P=0,029$) (Tabela 11). Por outro lado, a ingestão de carboidratos tem influência inversa com os marcadores metabólicos anteriores, sendo inversamente correlacionada com a pós-prova de glicose ($r=-0,349$, $P=0,017$), $\Delta\%$ ($r=-0,307$, $P=0,038$), insulina ($r=-0,380$, $P=0,009$), HOMA-IR ($r=-0,409$, $P=0,005$) e HOMA- β ($r=-0,317$, $P=0,032$) (Tabela 11). E a ingestão de cálcio foi inversamente correlacionada com $\Delta\%$ de glicose ($r=-0,290$, $P=0,044$) (Tabela 11).

Diferenças significativas em relação às correlações entre a composição corporal e óssea e marcadores metabólicos também foram encontradas. O estado antropométrico e de composição corporal dos atletas antes da corrida foram significativamente associados aos valores da pós-corrida de ácido úrico, Gla-OC e testosterona. Especificamente, os valores da pós-prova do ácido úrico foram diretamente associados ao peso ($r=0,344$, $P=0,018$), perímetro da cintura ($r=0,357$, $P=0,012$), massa muscular esquelética ($r=0,393$, $P=0,005$) e conteúdo mineral ósseo ($r=0,346$, $P=0,014$) (Tabela 11). Para os níveis de Gla-OC pós-prova, obtiveram-se correlações diretas para o IMC ($r=0,353$, $P=0,012$) e a massa muscular esquelética ($r=0,311$, $P=0,028$). Para o outro marcador ósseo, a testosterona, os níveis pós-prova estiveram diretamente associados ao IMC ($r=0,375$, $P=0,007$), ao perímetro da cintura ($r=0,422$, $P=0,003$) e $\Delta\%$ de testosterona com %MG ($r=0,304$, $P=0,032$), embora com uma correlação inversa com MLG ($r=-0,30$, $P=0,032$). Os marcadores ósseos pós-corrida estiveram correlacionados entre eles (Gla-OC *versus* testosterona: $r=0,290$, $P=0,041$). Por um lado, os níveis de Gla-OC pós-corrida foram diretamente associados à glicose pós-corrida ($r=0,280$, $P=0,045$), creatinina ($r=0,538$, $P<0,0001$) e ácido úrico ($r=0,338$, $P=0,016$); e, por outro, os níveis de testosterona pós-corrida estiveram diretamente associados à creatinina e ao ácido úrico ($r=0,344$, $P=0,014$; $r=0,303$, $P=0,032$, respectivamente).

Após este exercício extenuante, a miocina IL-6 esteve inversamente correlacionada com o IMC ($r=-0,281$, $P=0,048$) e diretamente correlacionada com a variação dos seguintes marcadores metabólicos: ácido úrico ($r=0,341$, $P=0,015$), insulina ($r=0,287$, $P=0,042$), HOMA-IR ($r=0,289$, $P=0,042$) e HOMA- β ($r=0,315$, $P=0,026$) (Tabela 11).

Tabela 11: Correlações lineares (r) entre a composição corporal, os marcadores nutricionais, ósseos e metabólicos após a corrida corrigidos pelo volume plasmático.

	Peso	IMC	Cintura	FM	FFM	SMM	BMC	Carbo.	Vit. D	Vit. K	Ca.	Creatinina	Acid Uri	Glicose	Insulina	HOMA-IR	HOMA-B	T	
IMC	0.644																		

Cintura	0.726	0.757																	
	****	****																	
FM	0.051	0.481	0.425																
	****	****	****																
FFM	-0.051	-0.481	-0.425	-0.658															
	****	****	****	****															
SMM	0.888	0.501	0.647	-0.141	-0.331														
	****	****	****	****	****														
BMC	0.817	0.212	0.453	-0.369	0.369	0.822													
	****	****	****	****	****	****													
Carbo.	-0.155	-0.054	-0.065	0.094	-0.078	-0.119	-0.113												
	****	****	****	****	****	****	****												
Vit. D	-0.100	-0.008	-0.043	0.026	0.061	-0.094	-0.056	0.513											
	****	****	****	****	****	****	****	****											
Vit. K	0.026	0.209	0.030	0.228	-0.107	-0.012	-0.075	-0.113	0.052										
	****	****	****	****	****	****	****	****	****										
Ca.	-0.087	0.067	-0.079	-0.001	0.082	-0.107	-0.081	0.730	0.613	0.147									
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****									
Creatinina	0.191	0.235	0.261	0.182	-0.096	0.207	0.086	0.086	-0.082	0.278	-0.004								
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****								
Ácido úrico	0.334	0.231	0.357	0.049	-0.181	0.393	0.346	-0.202	-0.163	0.191	-0.243	0.300							
	**	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	**							
Glicose	0.071	0.048	0.130	0.131	0.029	-0.018	0.075	-0.349	-0.290	0.326	-0.290	0.412	0.323						
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	**						
Insulina	0.267	0.183	0.182	-0.031	-0.014	0.178	0.208	-0.380	-0.177	0.328	-0.214	0.256	0.280	0.535					
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****					
HOMA-IR	0.214	0.172	0.200	0.054	0.003	0.128	0.175	-0.409	-0.216	0.315	-0.233	0.268	0.263	0.725	0.954				
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****			
HOMA-B	0.245	0.160	0.109	-0.101	-0.047	0.173	0.151	-0.317	0.115	0.322	-0.170	0.140	0.145	0.198	0.913	0.769			
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
T	0.231	0.375	0.422	0.304	-0.304	0.251	0.152	0.004	0.009	-0.121	0.050	0.344	0.303	0.269	0.196	0.266	0.049		
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	
Gla-OC	0.276	0.353	0.269	0.103	-0.126	0.311	0.186	-0.216	-0.086	0.204	-0.171	0.538	0.338	0.284	0.256	0.252	0.176	0.290	
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
IL-6	-0.080	-0.281	-0.195	-0.090	0.087	-0.048	0.074	-0.186	-0.185	0.025	-0.234	0.122	0.341	0.172	0.287	0.289	0.315	-0.185	
	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

Correlações de Spearman; -, designa que a correlação é dirigida negativamente (inversa); * P < 0,1; ** P < 0,05; *** P < 0,01; **** P < 0,0001; Pós-corrida corrigida = Pós-corrida não corrigida x (1 + ΔPlasma volume (%)/100); Δ%, magnitude de efeito corrigida para o volume plasmático, [Δ% = 100 x (Correção pós-corrida - Pré-corrida / Pré-corrida)]; IMC, índice de massa corporal (Kg / m²); FM, percentagem de massa gorda (%); FFM, massa livre de gordura (%); SMM, massa muscular esquelética (Kg); BMC, conteúdo mineral ósseo (Kg); Carbo., Carbohidratos (g/dia); Vit. D, vitamina D (µg); Vit. K, vitamina K (µg); Ca, cálcio (mg); Creatinina (mg/dL); Ácido úrico (mg/dL); Glicose (mg/dL); Insulina (mU/mL); T, testosterona (pg/mL); Gla-OC, osteocalcina carboxilada (ng/mL); IL, interleucina 6 (pg/mL); a, Correlações obtidas entre valores de Δ%; Outras correlações que mostraram ser significativas b, Δ% r = -0,307, P = 0,038; c, Δ% r = 0,290, P = 0,041; d, Δ% r = 0,540, P < 0,0001; e, Δ% r = 0,944, P < 0,0001; f, r = 0,942, P < 0,0001; g, Δ% r = 0,792, P < 0,0001. Para as correlações de IL-6, foram considerados os seguintes modelos: h, Δ% Ácido úrico vs Pós-corrida IL-6; i, Δ% Insulin vs Pós-corrida IL-6; j, Δ% HOMA-IR vs pós-corrida IL-6; i, Δ% HOMA-B vs pós-corrida IL-6.

Curiosamente, os atletas com nove etapas apresentaram níveis aumentados de creatinina pós-corrída (P=0,001), ácido úrico (P=0,050), glicose (P=0,002), insulina (P=0,048) e HOMA-IR (P=0,013) (Tabela 12). Os que terminaram todas as etapas mantiveram esse padrão para os parâmetros metabólicos acima mencionados e ainda mais uma variação significativa com o aumento da miocina IL-6 em mais de 500% de aumento (P=0,043).

Os atletas mais lentos apresentaram níveis mais altos de IL-6 pós-corrída e uma variação positiva de HOMA- β comparando com os outros grupos de velocidade média, especialmente, entre o grupo intermediário (P=0,019 e P=0,020, respectivamente) (Figura 12, 1.a e 1.b).

Além disso, 37 atletas terminaram as nove etapas e foram incluídos em tercís de acordo com o tempo para completar a corrída (rápido: ≤ 3715 min, intermediário: 3715-4030 min e mais lento: ≥ 4030 min). Para esta análise estratificada, diferenças significativas na glicose, HOMA- β e Gla-OC foram encontradas entre os grupos (Figura 12). A glicemia, tanto após a prova quanto a sua variação, foi significativamente maior nos atletas mais lentos em comparação com os demais grupos (P<0,05) (Figura 12 a e b). Ao contrário, os níveis de pós-prova e magnitude de efeito para HOMA- β foram significativamente menores nos atletas mais lentos (P<0,005) (Figura 12 c e d). No que respeita aos marcadores ósseos, a variação dos níveis de Gla-OC foi significativamente menor nos atletas rápidos (Figura 12 e).

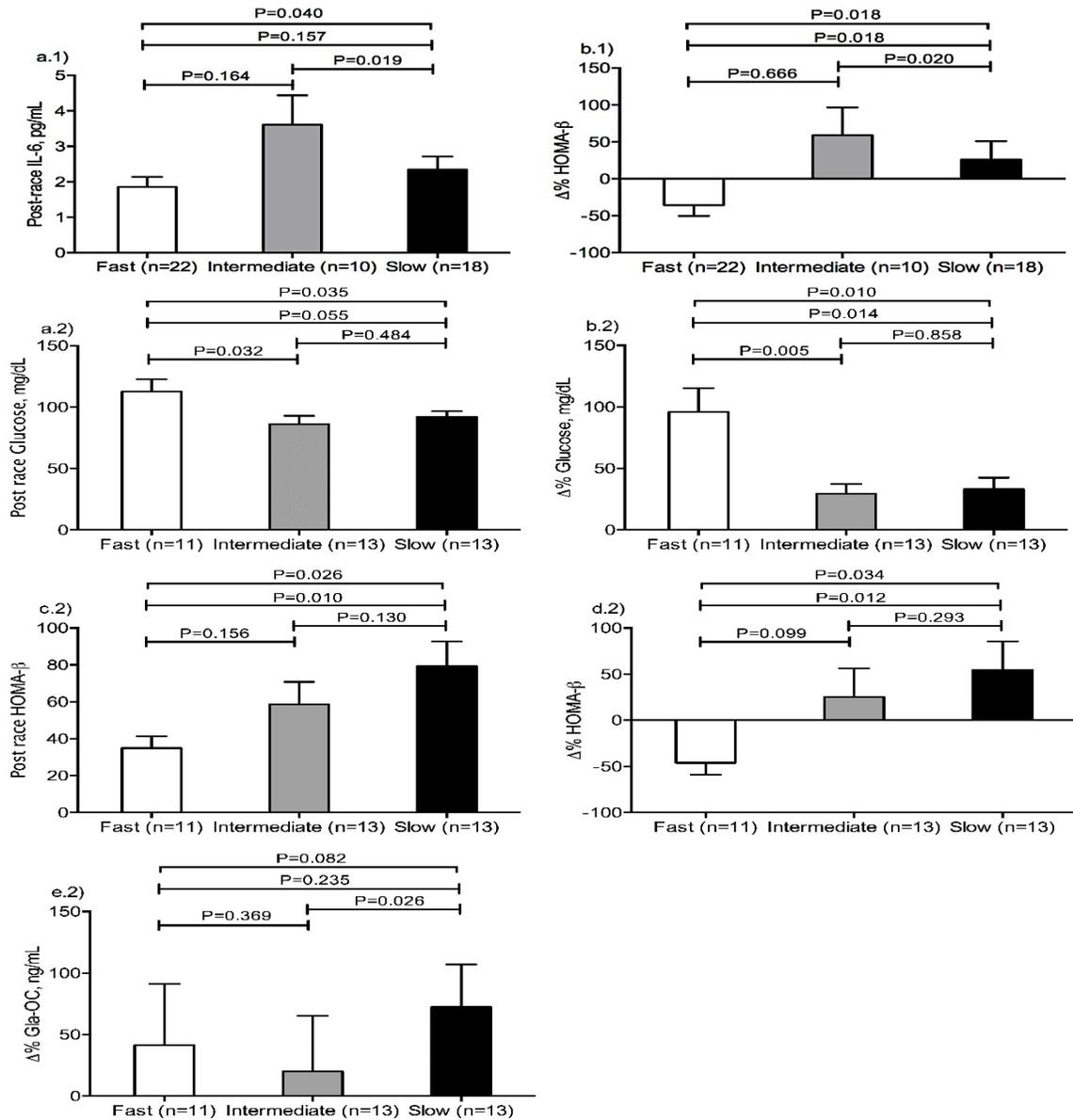


Figura 12: Comparações de parâmetros metabólicos e ósseos de acordo com a velocidade média (a1 e b1) e o tempo total em minutos para completar a prova (a.2 a e.2). A comparação entre os valores da tendência central foi feita através de Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de Mann-Whitney, com valores expressos como média ± SEM.

Tabela 12: Comparações entre atletas que completaram (n=37) versus os que não completaram (n=13) as nove etapas da ultramaratona de ciclismo TransPortugal

	Pré-corrida			Pós-corrida corrigido			Δ%		
	< 9 etapas (n=16)	9 etapas (n=38)	P *	< 9 etapas (n=13)	9 etapas (n=37)	P *	< 9 etapas (n=13)	9 etapas (n=37)	P *
Creatinina, mg/dL	0,9 (0,8 – 0,9)	0,9 (0,8 – 1,0)	0,001	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,04	0,924 [†]	+ 4,9 ± 5,8	+ 32,9 ± 4,8	0,002
Ácido úrico, mg/dL	4,5 (3,9 – 5,1)	4,5 (3,9 – 5,2)	0,050 [†]	5,9 (5,3 - 7,2)	7,7 (6,0 – 8,9)	0,676 [†]	+37,3 (23,2 - 59,1)	+ 58,1 (39,2 – 80,1)	0,062 [†]
Glicose, mg/dl	65,5 (57,0 - 80,5)	68,0 (56,0 – 75,0)	0,002 [†]	65,0 (58,8 - 80,0)	92,1(77,3 – 112,9)	0,705 [†]	-4,1 (-23,5 – 31,2)	+ 42,9 (10,3 – 75,0)	0,007 [†]
Insulina, mU/mL	12,9 (6,5 – 33,3)	10,7 (6,7 – 17,3)	0,048 [†]	8,3 (5,9 - 10,9)	12,2 (7,3 – 19,3)	0,616 [†]	-54,2 (-73,6 – 1,0)	+ 11,7 (-53,4 – 81,9)	0,053 [†]
HOMA-IR	1,6 (1,0 – 4,7)	1,6 (1,1 – 2,7)	0,013 [†]	1,2 (1,1-1,7)	2,1 (1,2 – 4,2)	0,820 [†]	-29,0 (-73,2 – 1,6)	+ 30,0 (-49,7 – 177,1)	0,015 [†]
HOMA-B	66,8 (31,5 – 163,8)	55,6 (30,1 – 126,4)	0,283 [†]	36,9 (19,7 - 59,2)	41,7 (28,9 – 86,4)	0,609 [†]	-59,0 (-71,5 -11,9)	-26,2 (-61,4 – 49,6)	0,181 [†]
Testosterona, pg/mL	7,0 (5,1 – 8,5)	7,2 (5,8 – 9,6)	0,720	6,7 ± 0,9	7,1 ± 0,6	0,538 [†]	-8,8 (-27,3 – 28,7)	+ 1,4 (-32,9 – 20,8)	0,420 [†]
Gla-OC: Osteocalcina, ng/mL	12,9 (7,2 – 23,6)	15,8 (10,2 – 26,1)	0,324	16,7 ± 2,8	19,9 ± 1,6	0,363 [†]	+ 12,9 (-0,3- 45,7)	-3,0 (-32,7 – 27,8)	0,264 [†]
IL-6, pg/mL	0,3 (0,3 – 0,6)	0,3 (0,2 – 0,5)	0,099 [†]	1,4 (0,8 – 2,2)	1,8 (1,3 – 3,8)	0,399 [†]	+ 219,6 (78,1- 556,4)	+ 554,9 (294,4 – 1018,9)	0,043 [†]

Os dados são apresentados como média ± SEM ou mediana (intervalo interquartil) de acordo com a saída da normalidade; * Valor P calculado usando grupos independentes – teste t, exceto quando mencionado de outra forma; † comparação entre pré e pós-corrida com o teste de Wilcoxon; Pós-corrida corrigida = Pós-corrida não corrigida × (1 + ΔPlasma volume (%) / 100); Δ%, magnitude de efeito corrigida para o volume plasmático, [Δ% = 100 × (Correção pós-corrida – Pré-corrida / Pré-corrida)]; A, valores pós-corrida sem correção para o volume plasmático; Gla-OC, osteocalcina carboxilada; IL, interleucina 6.

As frequências de genótipos foram analisadas em polimorfismos conhecidos genes: *LEP* (homozigótico G 0,29, heterozigótico 0,51 e homozigótico A 0,20), *ADRB2* (homozigoto Gli 0,51, heterozigótico 0,25 e homozigótico Arg 0,07) e *BGLAP* (T homozigótico 0,60, heterozigóticos 0,31 e homozigoto C 0,09). Os portadores do alelo A do polimorfismo *LEP* foram mais preponderantes no grupo dos que terminaram todas as etapas da ultramaratona, ajustando-se para idade, género, velocidade média e linha de base da percentagem de massa gorda e perímetro de cintura (OR=5,0 [1,1-22,5], P=0,036) (Tabela 13). Curiosamente, esse modelo perde significância estatística quando é também ajustado por percentagem de variação de glicose, sendo um possível modulador para os atletas completarem todas as etapas da prova (% de glicose: OR=1,0 [1,0-1,0], P=0,040) (dados não mostrados). Além disso, os atletas portadores do alelo A do polimorfismo *LEP* apresentaram uma predisposição favorável para terminarem a corrida mais rápido, após o ajustamento para idade, percentagem de massa gorda na pré-prova, perímetro de cintura em pré-corrida e com todas as etapas (OR=8,0 [1,1-61,1], P=0,044) (Tabela 13). Os polimorfismos *BGLAP* e *ADRB2* não foram associados aos atletas terem terminado todas as etapas da ultramaratona ou nem com o tempo para completarem a corrida (dados não apresentados).

Tabela 13: Razões de risco para prever dois desfechos finais de desempenho na ultramaratona de ciclismo TransPortugal usando o polimorfismo *LEP* -2548 G> A ajustado para covariáveis relevantes.

Modelo A				
	< 9 etapas (n=16)	9 etapas (n=38)	OR [CI 95%]	P
GG	8 (50,0)	8 (21,1)	Referente	
AA + AG	8 (50,0)	30 (78,9)	5,0 [1,1-22,5]	0,036
Modelo B				
	Lentos (n=25)	Rápidos (n=18)	OR [CI 95%]	P
GG	10 (40,0)	2 (11,1)	Referente	
AA + AG	15 (60,0)	16 (88,9)	8,3 [1,1-61,1]	0,044

Modelo A, para portadores alelo A ajustadas para idade, género, % de massa gorda pré-corrida e cintura; e velocidade média; Modelo B, para portadores do alelo A ajustadas para idade, % de massa gorda pré-corrida e cintura. Para este modelo, os grupos foram determinados por tercís de velocidade média (rápido, $\geq 0,31$ km/min., lento, $\leq 0,29$ km/min.). Os valores para as frequências de genótipos representam frequências absolutas (frequências relativas, %).

Houve também significativas interações genótipo-fenótipo, intermediário bioquímico considerando ambos os grupos de atletas (Figuras 13 e 14). Apresentamos resultados utilizando os modelos recessivos para as variantes genéticas dos genes *BGLAP* e *LEP* e o modelo dominante para a variante genética do gene *ADRB2*. Os portadores A do polimorfismo

LEP foram associados com maior percentagem de variação de ácido úrico e Gla-OC (Figura 1). No grupo de atletas que completaram as nove etapas, os portadores homocigóticos A da *LEP* apresentaram na fase pós-corrida um aumento de ganho na IL-6 (Figura 14), embora em todos os atletas essa interação tenha sido apenas uma tendência (Figura 13). Para o polimorfismo do *ADRB2*, os portadores do genótipo G apresentaram níveis mais baixos na fase pós-corrida da insulina, do HOMA-IR e do HOMA-B (Figuras 13 e 14). Para o polimorfismo do *BGLAP*, os portadores do genótipo C apresentaram níveis mais elevados no pós-prova e percentagens de variação do HOMA-IR e do HOMA-B (Figuras 13 e 14), exceto os valores pós-corrida de HOMA-B para todas as análises de atletas (Figura 13). Para os níveis de Gla-OC, os portadores do genótipo C apresentaram valores mais elevados somente quando se considera a análise para os finalizadores das nove etapas (Figura 2).

A análise da covariância mostrou efeito significativo dos portadores do alelo A do polimorfismo da *LEP* na variação dos níveis circulantes de glicose ($F=4,712$, $P=0,036$), controlando para as variações da Gla-OC e da IL-6, para a idade, velocidade média e para os que terminaram as nove etapas. No último modelo, a velocidade média e a variação da IL-6 para os finalizadores foram afetadas pela variação dos níveis circulantes de glicose ($F=5,578$, $P=0,023$; $F=4,340$, $P=0,043$; $F=7,12$, $P=0,011$, respetivamente). Além disso, a análise da covariância mostrou o efeito significativo da condição da massa muscular esquelética basal (antes da prova) na variação dos níveis circulantes de Gla-OC ($F=4,650$, $P=0,037$), controlando para a variação dos parâmetros do ácido úrico, creatinina, glicose, idade, velocidade média e dos que terminaram todas as etapas.

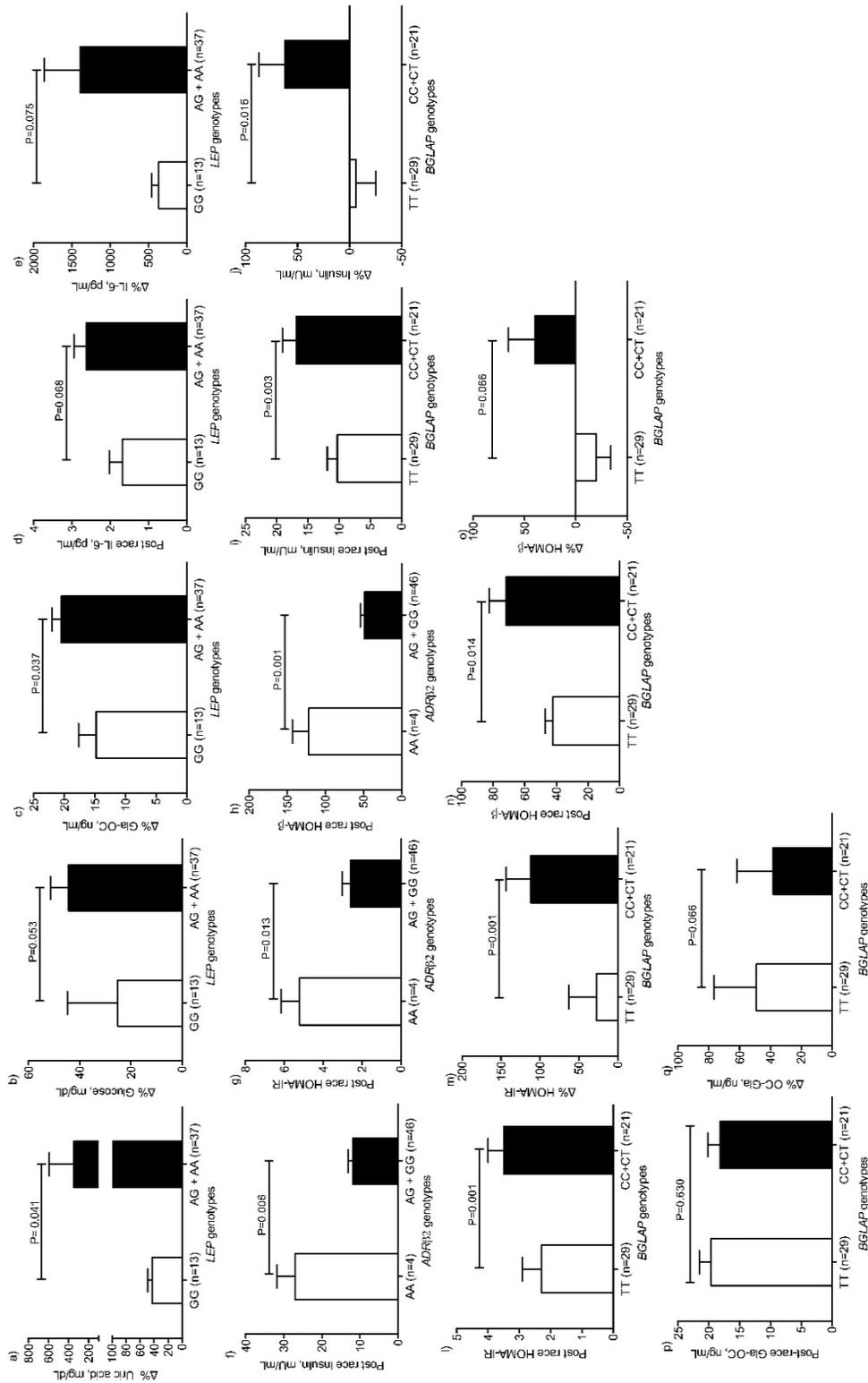


Figura 13: Comparações de parâmetros metabólicos e ósseos de acordo com os polimorfismos dos genes LEP, ADRB2 e BGLAP para os todos atletas. A comparação entre os valores da tendência central foi feita através de Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de Mann-Whitney, com valores expressos como média ± SEM.

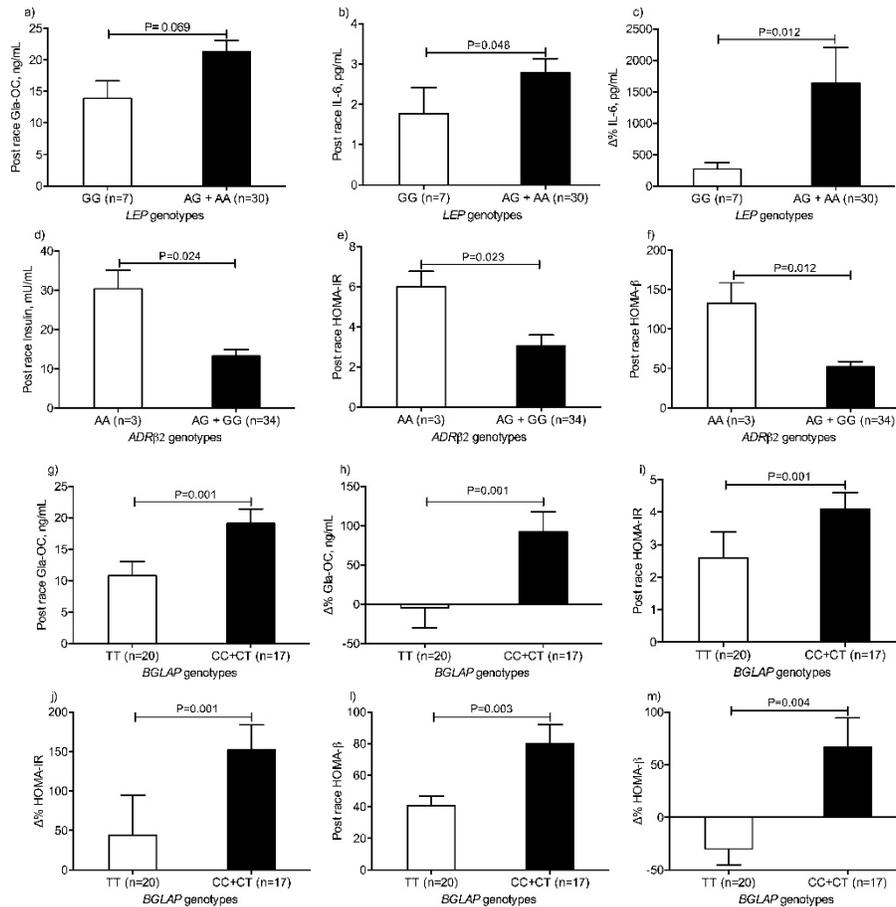


Figura 14: Comparações de parâmetros metabólicos e ósseos de acordo com os polimorfismos LEP, ADRB2 e BGLAP para os atletas que completaram as nove etapas (n=37). A comparação entre os valores da tendência central foi feita através de Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de Mann-Whitney, com valores expressos como média ± SEM.

Especificamente, a corrida TransPortugal, que é uma corrida de ciclismo de montanha de nove dias consecutivos, é caracterizada por uma atividade de performance sem carga. Os exercícios exaustivos de longa duração têm sido recentemente associados a sérias lesões nos órgãos e sistemas, nomeadamente, músculos e, finalmente, influenciando nos níveis saudáveis dos marcadores ósseos. A prova TransPortugal de ciclismo de montanha, é uma prova de resistência com uma magnitude específica de impacto e mais importante ainda, sem carga. De acordo com outros tipos de corridas de ciclismo, o impacto na densidade mineral óssea (DMO) é bastante diferente (Guillaume, Chappard, & Audran, 2012). Quando comparamos o ciclismo de montanha com o ciclismo de estrada observa-se que há uma

relação de maior tempo gasto com dois pontos de contato (mãos e pés) em vez de três pontos (assento, mãos e pés), que acaba por causar uma carga maior nos membros inferiores através dos pedais (Warner, Shaw, & Dalsky, 2002). Além disso, um aspeto que não foi tratado pelo grupo de Warner para além do impacto nos membros inferiores, o impacto sofrido na coluna vertebral, que também podem modular a DMO. Na TransPortugal, o impacto é considerável em todo o corpo devido ao atingimento frequente ao passar por superfícies duras e irregulares, especialmente dos membros inferiores, coluna e braços, capazes de induzir hemólise (Alonso *et al.*, 2017). Além disso, a interação do músculo com osso é altamente imperativa no equilíbrio metabólico. É necessária uma melhor compreensão do metabolismo ósseo para compreender a interação entre osso e músculo, pois atualmente são considerados ambos órgãos endócrinos (Oldknow, MacRae, & Farquharson, 2015; Pedersen & Febbraio, 2012).

A homeostase do tecido ósseo é vital para a funcionalidade do corpo humano, com base nas suas características mecânicas, proteção e atividade metabólica.

Em primeiro lugar, a contração muscular e os efeitos acumulados do exercício induzem uma lesão sistémica, conduzindo a um processo inflamatório, acompanhado de uma resposta imunológica e metabólica, apesar da capacidade adaptativa fisiológica do atleta (M. Pedersen *et al.*, 2012). A contração muscular e do ponto de vista inflamatório, a interleucina (IL)-6, uma miocina libertada pelo músculo esquelético, mostrou uma resposta mais acentuada, modulando o efeito anti-inflamatório desse exercício. Além desta associação imediata, a IL-6 foi também identificada como sensor de energia (Nimmo, Leggate, Viana, & King, 2013). A sinalização da IL-6 pode ter um papel fundamental no tecido hepático, conduzindo a uma diminuição do glicogénio do fígado e ao aumento da resposta a um exercício exaustivo da natureza prolongada (Banzet *et al.*, 2009). Este grupo sugeriu que, durante um exercício muito exigente, a IL-6 derivada de músculo poderia ajudar a aumentar a produção de glicose hepática e a libertação de ácidos gordos pelo tecido adiposo para fornecer combustível suficiente para atender as necessidades metabólicas extra. Estes efeitos da IL-6 no fígado e no tecido adiposo são mediados pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Chevion *et al.*, 2003). Na TransPortugal, os atletas experimentaram um aumento esperado muito significativo após este exercício extenuante, diferenciador dos que completaram ou não todas as etapas, na média de velocidade e na associação à lesão muscular (ácido úrico) e a regulação da libertação da insulina e sensibilidade dos tecidos periféricos (insulina, HOMA- β , HOMA-IR).

Outro indicador de lesão muscular por contração muscular excessiva refletiu-se nos níveis aumentados de ácido úrico e creatinina. O ácido úrico é um reflexo do catabolismo no músculo esquelético das purinas (adenina) e na creatinina que, além de ser um marcador envolvido na depuração proteica geral ao nível renal, é um produto da degradação da fosfocreatina no músculo esquelético, em resposta à alta demanda metabólica e à geração de ATP pela Adenil miocinas muscular. (Chevion *et al.*, 2003).

Durante o exercício intenso e prolongado, o músculo esquelético ativo é muito dependente de carboidrato para manter a síntese de ATP e a contração do muscular (Banzet *et al.*, 2009). A glicogénólise mediada pelo estímulo dos recetores adrenérgicos e a fosforilação (ativação) do glicogénio pela fosforilase no músculo esquelético pela adrenalina libertam lactato para a circulação que é depois convertido em glicose no fígado (ciclo Cori). No entanto, após exercícios exaustivos prolongados, o conteúdo de glicogénio do músculo esquelético é reduzido em 50-70% e as necessidades em glicose para os órgãos dele dependentes (cérebro, eritrócitos, entre outros) aumenta, então a síntese de ATP será originada de catabolismo menos rápido através da oxidação de ácidos gordos. (Hermansen, Hultman, & Saltin, 1967; Jørgen Jensen *et al.*, 2011; Karlsson & Saltin, 1971).

O aumento dos níveis de glicose plasmática e a resistência à insulina (refletidos nos níveis aumentados de HOMA-IR e níveis mais baixos de HOMA- β) observados após a corrida TransPortugal identificam uma gluconeogénese mais ativada. Ainda mais, e de acordo com a ingestão de nutrientes, esses atletas apresentaram ingestão baixa ou insuficiente de carboidratos, para este tipo de atividade, o que poderia resultar na glicólise como uma via preferencial para o abastecimento de combustível. Estas alterações no metabolismo da glicose e a produção de espécies reativas de oxigénio a partir de intermediários lipídicos no músculo esquelético podem, a longo prazo, causar uma resistência à insulina (J. Jensen *et al.*, 2006; T. E. Jensen, Wojtaszewski, & Richter, 2009).

Quando nos referimos aos atletas, que completaram as nove etapas da TransPortugal, podemos ter uma capacidade de exercício ideal e máxima, com vários processos que ocorrem simultaneamente, nomeadamente um alto teor de glicogénio resultante do aumento da síntese de glicogénio estimulado pela insulina e um aumento do fluxo glicolítico.

Os exercícios extenuantes podem ser deletérios com implicações sérias, não só no músculo, mas também na remodelação óssea. Apesar dos achados recentes ainda não serem claros e serem polémicos, a hipótese é que o exercício de impacto, como o ciclismo, além de

influenciar o perfil metabólico e muscular esquelético, representa um importante modelo de alterações profundas no metabolismo ósseo. Notavelmente, a carga contribui, mais do que outras variáveis, para mudanças importantes no anabolismo ósseo e ainda mais com interferência metabólica (B. K. Pedersen & Febbraio, 2012).

A libertação de IL-6 induzida pelo exercício que está envolvida em parte no efeito adaptativo ao exercício influencia uma menor geração de osteocalcina bioactiva Glu (OC). Além de regular a absorção de nutrientes e do catabolismo, a sinalização através de osteocalcina nas fibras musculares também é responsável pela maior parte do aumento nos níveis circulantes de IL-6 induzido pelo exercício (Levinger *et al.*, 2017). Portanto, uma regulação direcionada que interliga as funções endócrinas do osso e do músculo parece ser necessária e suficiente para favorecer a adaptação ao exercício.

O osso é um órgão endócrino que rege a secreção de insulina e a homeostase da glicose. O metabolismo ósseo é regulado por várias hormonas, muitas delas são analisados aqui. A insulina ativa o anabolismo ósseo e uma fisiologia da insulina desregulada afeta profundamente o metabolismo ósseo. A insulina aumenta a síntese de OC no osteoblasto, através da indução do fator de transcrição Runx2, mas também estimula os osteoclastos, envolvidos na descarboxilação de OC, ao suprimir a expressão de osteoprotegerina (receptor solúvel do Rank-l) em osteoblastos (Gonzalez *et al.*, 2016). Assim, a insulina estimula a remodelação óssea e a libertação de Glu-OC, que, por sua vez, influencia a sensibilidade e a secreção da insulina, e o aumento da sensibilidade à glicólise. O Glu-OC contribui para o metabolismo energético e a homeostase da glicose em murganhos, atuando nos ilhéus de Langerhan, estimulando a proliferação de células β e aumentando a secreção de insulina e secundariamente a sensibilidade à insulina (Karsenty & Mera, 2017).

O OC é produzido pelo osso (osteoblastos), a forma carboxilada (Gla-OC) permanece na matriz óssea devido à afinidade que possui para a hidroxiapatita e a forma Glu-OC resulta da descarboxilação da forma Gla-OC pelos osteoclastos (acidificação) que circula e atua nos diferentes órgãos (músculo, intestinos, pâncreas endócrino, cérebro), ou seja, está hormonalmente ativa. Embora não estatisticamente significativo, o Gla-OC aumentou ligeiramente após a corrida TransPortugal. De facto, os nossos principais achados em relação aos níveis de Gla-OC foram associados a um aumento da variação para os atletas mais lentos que completaram as nove etapas. A verdadeira importância fisiológica no osso da proteína Gla-OC não é completamente compreendida, uma vez que modelos animais com ganho ou perda da sua função não apresentam alterações no fenótipo ósseo. O processo de acidificação

da matriz mineral óssea nas lacunas de reabsorção da responsabilidade dos osteoclastos conduz ao resultado de que a osteocalcina carboxilada perderia os seus ácidos glutâmicos, transformando-se em Glu-OC.

Poderia ser este Gla-OC um indicador indireto de níveis mais elevados de Glu-OC? Muitas variáveis alteradas poderiam contribuir negativamente para a carboxilação da osteocalcina. Por exemplo, os níveis diminuídos de ingestão de vitamina K e a resistência à insulina (Tabela 11). Se houver deficiência em substratos ou nutrientes (vitamina K), essa produção de osteocalcina e uma carboxilação também podem estar comprometidas. Existem duas formas que podem ser responsáveis por este processo, em que os nutrientes são nutricionalmente insuficientes, com um déficit real na ingestão dietética em nutrientes específicos que interferem com o remodelamento ósseo, como o cálcio que, além de interferir com a remodelação óssea, interfere na contração muscular, através da actina e da miosina e nos canais de cálcio; de vitamina D3, que atua como coadjuvante no metabolismo ósseo e na vitamina K, que atua profundamente na descarboxilação da osteocalcina.

Esta diminuição nos níveis circulantes de osteocalcina ocorre no momento em que a capacidade dos ratos para realizar declínios de exercício e os níveis circulantes de osteocalcina não aumentam na mesma medida em murganhos de 6 ou 12 meses como em ratos de 3 meses de idade durante o exercício (Mera *et al.*, 2016). Além disso, Comassi *et al.*, 2014 encontraram níveis mais baixos em atletas que realizaram meio Ironman (Comassi *et al.*, 2015). Previamente foi comentado que, na ausência de carga, uma atividade de resistência extenuante (como, por exemplo, no Giro d'Italia, uma grande corrida de ciclismo por etapas) diminuiu as concentrações séricas de OC total enquanto aumenta a fração Glu-OC relativa (Lombardi, Sanchis-Gomar, Perego, Sansoni, & Banfi, 2016).

Também a leptina, no nosso caso, avaliada indiretamente pelo seu polimorfismo, regula positivamente o metabolismo ósseo diretamente ou indiretamente através de circuitos neurais. As alterações na Gla-OC e indiretamente na Glu-OC foram associadas a modificações na adiponectina e inversamente relacionadas à leptina e ao gasto de energia. Embora os efeitos sobre o metabolismo ósseo sejam exercidos durante longos períodos de tempo, o forte esforço de uma corrida de etapas de várias semanas poderia ser suficiente para induzir modificações importantes (Lombardi *et al.*, 2012).

4.4. FATORES NEUROTRÓFICOS

Por fim, e dentro do mundo do desporto, muito se tem discutido a capacidade cognitiva para um melhor desempenho no desporto em geral e sobretudo em desportos extremamente exigentes como o referido no presente trabalho. O exercício exaustivo de longa duração, para além de ser extremamente exigente fisicamente, acarreta uma necessidade de atenção acrescida devido aos trilhos, ao pavimento irregular e às condições climatéricas.

O impacto deste tipo desportos no desenvolvimento cognitivo ou dos mecanismos envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos. Nas últimas décadas têm surgido alguns possíveis biomarcadores que poderão explicar uma resposta diferenciada entre atletas (Cotman, Berchtold, & Christie, 2007; Zoladz & Pilc, 2010).

Elevadas concentrações de citocinas no sistema nervoso simpático têm sido associadas com a desregulação de mecanismos apoptóticos no cérebro, tais como os fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) e com o aumento dos níveis de diversos fatores oxidantes (Gibney, McGuinness, Prendergast, Harkin, & Connor, 2013; Udina *et al.*, 2016).

O BDNF é uma neurotrofina que estimula o crescimento, a diferenciação, a reparação neuronal e a conectividade sináptica. Tem um fator crucial na resposta adaptativa do cérebro e do organismo em relação às variações metabólicas (Piacentini *et al.*, 2016). O stress crónico é considerado um dos reguladores negativos mais preponderantes da neurogénese no adulto (Puthuchearry *et al.*, 2011). O exercício intenso tem sido considerado como originando episódios repetitivos de stress agudo, que induzem uma ativação do HPA e poderão ser responsáveis por mudanças funcionais.

Neste último capítulo pretendeu-se analisar a interação da resposta neuromuscular, imune e de indicadores de stress em atletas expostos a uma prova de intensa e de longa duração.

Imediatamente após a prova, a libertação de BDNF não foi significativamente diferenciadora, nem a hormona de stress, o cortisol (Tabela 14) (Verbickas *et al.*, 2017). Verbickas *et al.* verificaram um aumento dos níveis circulatórios de BDNF, cortisol e IL-6, sobretudo após 2 minutos em dois tipos de exercício, ciclismo de corrida

e de “stretch-shortening” (alongamento-encurtamento). Contudo, após 24 horas os níveis de BDNF e cortisol diminuíram. A hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal poderá diminuir a produção de BDNF por via da ativação da resposta inflamatória, como pelo aumento da IL-6 (Tabela 14) (Verbickas *et al.*, 2017).

O exercício regular aeróbico de longa duração tem sido associado ao aumento dos níveis de BDNF (Gomez-Pinilla & Hillman, 2013; Voss *et al.*, 2013), tal como um exercício de alta intensidade (Saucedo Marquez, Vanaudenaerde, Troosters, & Wenderoth, 2015). No entanto, outros estudos não identificaram efeitos do exercício nos níveis circulatórios do BDNF (Huang, Larsen, Ried-Larsen, Moller, & Andersen, 2014; Murawska-Cialowicz, Wojna, & Zuwala-Jagiello, 2015). Outros pesquisadores relataram que o nível BDNF em repouso é inferior em atletas treinados em comparação com indivíduos não treinados (Huang *et al.*, 2014; Jeon & Ha, 2015).

Relativamente à influência do género nos parâmetros referidos, apenas o cortisol apresentou uma distribuição diferenciada, tendo as mulheres valores significativamente superiores aos homens, antes da prova ($3,6 \pm 1,7$ versus $1,3 \pm 0,1$, $P=0,048$, respetivamente) (dados não mostrados).

Tabela 14: Fatores neurotróficos e biomarcadores musculares antes da corrida, pós-corrida (corrigida para o volume de plasma e a respetiva magnitude de efeito ($\Delta\%$) na ultramaratona de ciclismo TransPortugal.

	Pré-corrida	Pós-corrida corrigida	P-value ^a	$\Delta\%$
IL-6, pg/mL	0,3 (0,2–0,6)	1,7 (1,2–3,3)	<0,0001 [†]	+ 1129,7 ± 352,0
Insulina, mU/mL	11,0 (6,7–24,3)	10,3 (6,3–17,3)	0,208 [†]	+ 22,6 ± 15,7
Plaquetas, n.10 ⁹ /L	258,1 ± 7,2	293,4 ± 10,9	<0,0001 [*]	+ 13,3 ± 2,6
BDNF sérico, ng/mL	39,3 (34,7–48,9)	37,4 (31,3–46,4)	0,163 [†]	-0,5 ± 3,8
Irisina, ng/mL	12,2 (9,0–18,6)	10,8 (6,7–15,2)	0,063 [†]	-1,5 ± 8,4
Cortisol salivar, ng/mL	1,1 (0,6-1,8)	3,3 (-49,4–106,8) [†]	0,393 [†]	+ 3,5 (-47,4 t-120,8)

Os dados são apresentados como médias ± SEM ou mediana (intervalo interquartil) de acordo com o teste da normalidade; Valores de P obtidos segundo a comparação entre o pré e pós-corrida usando * medidas repetidas t-test ou † teste de Wilcoxon; Pós-corrida corrigida para o volume plasmático = Pós-corrida sem correção x (1 + Δ Volume plasmático (%)/ 100)]; a, Valores pós-corrida sem correção para o volume plasmático.

Neste tipo de provas, pode verificar-se casos de trombocitose. Na nossa amostra, apesar de as plaquetas terem aumentado significativamente (Tabela 14), não estamos perante um caso de trombocitose (>450 n.10⁹L) (Heber & Volf, 2015). O aumento de BDNF descrito após alguns tipos de exercício poderá estar associado com a libertação de plaquetas pelo baço, provocado pela estimulação simpática dos recetores alfa

adrenérgicos (Walsh, Bentley, Gurd, & Tschakovsky, 2017). O tipo de exercício, a intensidade, carga e a própria preparação do atleta influenciam a expressão de BDNF, por outro lado, a gestão do esforço neste tipo de provas poderá interferir na interpretação dos resultados (Verbickas *et al.*, 2017). Apesar do aumento do número de plaquetas após a prova, este poderá não ter sido suficiente para a contínua libertação do BDNF.

Após a prova, os níveis de BDNF estiveram correlacionados diretamente com a percentagem de massa gorda ($r=0,286$) e inversamente com a massa muscular esquelética ($r=-0,469$) (Tabela 15). Em relação aos parâmetros metabólicos, o BDNF apresentou uma relação direta com a glicose ($r=0,294$) e plaquetas ($r=0,462$) (Tabela 15). A relação da IL-6 com a composição corporal e marcadores metabólicos já foi abordada em capítulos anteriores, no entanto, de ressaltar a relação direta com o marcador de stress, cortisol ($r=0,368$) (Tabela 15). Mais ainda, este último esteve correlacionado diretamente com creatinina ($r=0,319$), ácido úrico ($r=0,439$), glicose ($r=0,332$), insulina ($r=0,293$) e HOMA-IR ($r=0,373$) (Tabela 15).

Por outro lado, a irisina não revelou nenhuma relação com a composição corporal, perfil metabólico e com o marcador neurotrófico -BDNF (Tabela 15). Estas correlações poderão ser reflexo de uma atividade metabolicamente exigente, tendo a IL-6 e o cortisol reflexos dessa atividade por via inflamatória e hormonal, respetivamente. Esta prova induz lesões musculares importantes que se refletem, em primeira instância, num processo inflamatório e, por último, poderia ter impacto ao nível do sistema neuronal periférico (Verbickas *et al.*, 2017; Walsh *et al.*, 2017).

Os atletas da TransPortugal estão sujeitos a uma exacerbação do processo inflamatório que poderá inibir os efeitos neuromusculares. Por um lado, os atletas que estiveram expostos a todas as etapas da prova da TransPortugal (9 etapas) apresentaram valores significativamente superiores da percentagem de variação da IL-6 e do cortisol, que poderiam ter influenciado os níveis do BDNF uma vez que este aumentou, embora com uma tendência (Figura 16). Por outro, os níveis ligeiramente aumentados de BDNF nos atletas que terminaram todas as etapas poderá ser reflexo de uma maior capacidade de gestão de esforço, através dos múltiplos mediadores

incluídos no eixo HPA, no sistema nervoso autónomo, e em componentes do sistema imunológico.

Tabela 15: Correlações lineares (*r*) entre a composição corporal, marcadores metabólicos e neurotróficos após a corrida, corrigido para o volume de plasma.

	Pós-corrida		Pré-corrida											
	Peso	IMC	FM	SMM	Creatinina	Ácido Úrico	Glicose	Insulina	HOMA-IR	HOMA-B	BDNF	IL-6	Cortisol	Irisina
Plaquetas	0.110	0.164	0.324 **	-0.183	0.363 *** a	0.288 **	0.407 ***	0.212	0.269	0.095	0.462 ***	0.198	0.367 ***	0.324 **
BDNF	0.036	0.140	0.286 **	-0.469 ***	0.120	0.131	0.294 **	0.026	0.092	-0.085		0.033	0.204	
IL-6	-0.080	-0.281 **	-0.114	-0.036	0.122	0.341 *** b	0.172	** c	0.287	0.289	0.315 ** c	0.033	0.368 ***	0.033
Cortisol	-0.165	-0.165	-0.136	-0.170	0.319 ** a	0.439 *** a	0.332 ** a	0.293 ** a	0.373 ** a	0.036	0.072	0.393 ** a		0.072
Irisina	0.011	-0.062	0.151	-0.039	-0.014	-0.027	-0.110	-0.159	-0.126	-0.104	-0.010	0.029	-0.031	

Correlações Spearman; -, designa que a correlação é dirigida inversamente; **P<0,05; ***P<0,01; IMC, índice de massa corporal (kg / m²); FM, percentagem de massa gorda (%); SMM, massa muscular esquelética (kg); Creatinina (mg/dL); Ácido úrico (mg/dL); Glicose (mg/dL); Insulina (mU/mL); BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro (ng/mL); IL-6, interleucina 6 (pg/mL); cortisol (ng/mL); irisina (ng/ mL). Correlações obtidas entre valores pós-corrida corrigidos para o volume plasmático com exceção dos seguintes modelos assinalados: a, valores $\Delta\%$; b, $\Delta\%$ Ácido úrico versus Pós-corrida corrigido IL-6; c, $\Delta\%$ Insulina versus Pós-corrida corrigido IL-6; d, $\Delta\%$ HOMA-IR versus Pós-corrida corrigido IL-6; e, $\Delta\%$ HOMA-B versus Pós-corrida corrigido IL-6. Pós-corrida corrigida = Pós-corrida não corrigida \times (1 + Δ Plasma volume (%) / 100)]; $\Delta\%$, magnitude de efeito corrigida para o volume plasmático, [$\Delta\%$ = 100 \times (Correção pós corrigida - Pré-corrida / Pré-corrida)]

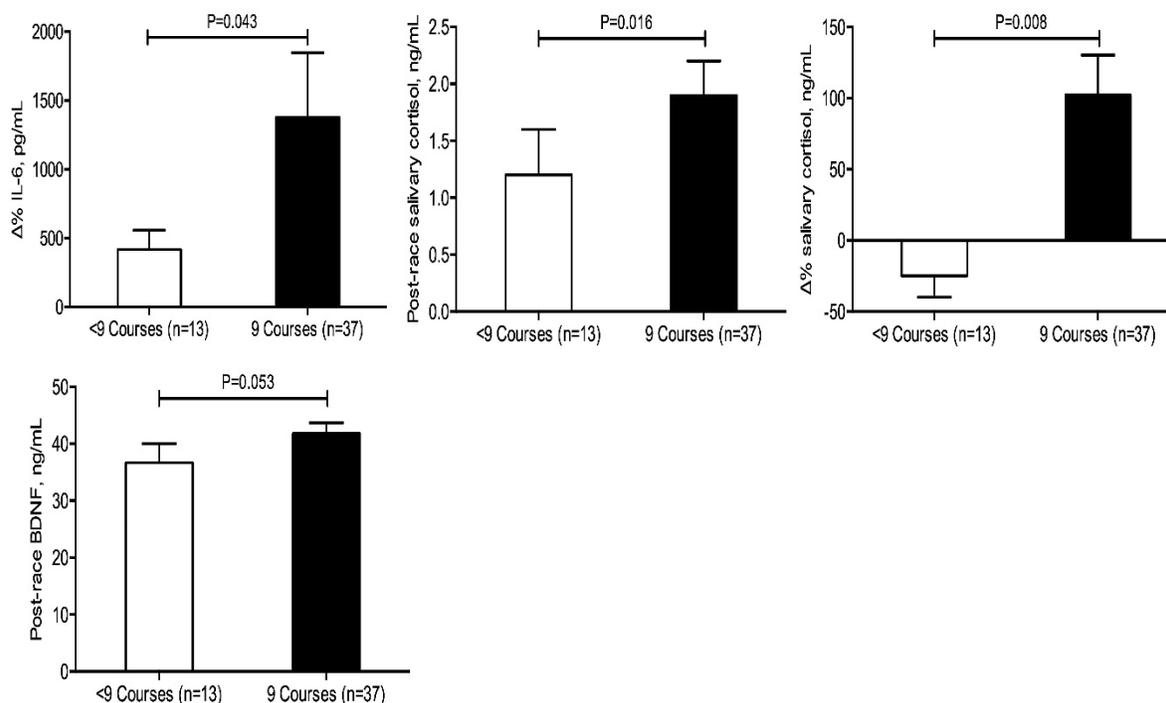


Figura 16: Comparações dos níveis de BDNF, cortisol e IL-6 para os atletas que completaram e não completaram as nove etapas. A comparação entre os valores da tendência central foi feita através de Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de Mann-Whitney, com valores expressos como média \pm SEM.

Mais ainda, na TransPortugal, os atletas passam muitas horas sozinhos em prova, sem saberem se o caminho tomado era realmente o correto. Esta situação acontece devido ao sistema de *handicaps*, com saídas em diferentes horários, o que provoca que, inúmeras vezes, os atletas estejam completamente isolados do grupo, fator que gera por vezes alguma ansiedade.

Apenas para os atletas que terminaram as nove etapas, os mais rápidos apresentaram valores superiores de BDNF em relação aos atletas no grupo intermédio ($P=0,013$) (Tabela 16). Exercícios com lesões musculares severas poderão estar associados à diminuição dos níveis de BDNF à semelhança de condições stressantes, implicando que este efeito secundário poderá não ser benéfico para, por exemplo, indivíduos com depressão, levando mesmo à fadiga central (Ieraci, Mallei, Musazzi, & Popoli, 2015).

Por outro lado, os níveis de irisina foram significativamente superiores para os indivíduos com uma melhor performance ($P=0.038$) (Tabela 16). A irisina é uma hormona recentemente, designada de miocina, que mimetisa o efeito benéfico do exercício aeróbico regular, no entanto, na nossa amostra não teve a representatividade esperada. Mais estudos serão necessários para esclarecer o papel da irisina em exercícios exaustivos de longa duração.

Tabela 16: Associação dos níveis do pré-corrida do BDNF e irisina com a velocidade média desempenhada pelos atletas que completaram as nove etapas da ultramaratona de ciclismo

Pré-corrida	Lento (n=16)	Intermédio (n=8)	Rápido (n=14)	P
BDNF sérica, ng/mL	41.0 (35.4-47.8)	34.2 (32.0-36.4)	43.7 (38.9-52.7)	0.052 c
Irisina, ng/mL	9.0 (6.1-11.8)	15.4 (11.0-25.6)	13.0 (11.4-16.2)	0.048 a, b

TransPortugal.

Teste Kruskal Wallis seguido de Mann-Whitney: a, rápido vs intermédio. $P=0,024$; b, rápido vs lento $P=0,038$; c lentos vs intermédio $P=0.013$.

O HPA é ativado por vários mediadores, nomeadamente o lactato que apresenta um papel importante na estimulação da secreção de cortisol durante o exercício agudo (Duclos & Tabarin, 2016). Na nossa população, apesar de após o exercício não se terem observado diferenças significativas, os atletas expostos a mais tempo de prova apresentaram valores significativamente superiores aos atletas com menos de nove

etapas (Kraemer & Ratamess, 2005). Ratames *et al.* retificaram que um exercício de esforço intenso induz um aumento considerável dos níveis de cortisol. Neste sentido, o tipo de atividade de “endurance” pode levar à produção de cortisol, como fator de stress, refletindo ainda o excesso de horas de exercício e a necessidade de concentração (prova em autossuficiência) a que estes atletas, em particular, estiveram submetidos.

Os níveis de BDNF também podem ser modulados de acordo com o padrão nutricional, nomeadamente, sabe-se que o exercício e a restrição energética podem melhorar a neurogénese envolvendo um mecanismo de sobre-expressão do BDNF, e do fator de crescimento ligado à insulina (IGF-1), assim como derivados do fator de crescimento do endotélio, como, por exemplo, os nitratos (Borror, 2017). Tal como foi abordado já na parte Ecossistema e Estrutura dos Atletas (4.1), antes da prova, os atletas apresentavam em média um consumo energético inferior às recomendações internacionais, o que poderia levar a prever uma maior expressão de BDNF, sobretudo após uma prova como a TransPortugal. Uma vez que, por exemplo, a restrição calórica de 30% do valor energético total (VET) parece melhorar a função cognitiva a longo prazo (Mattson, 2012). Apesar de não ter sido possível controlar a ingestão alimentar ao longo da prova, supomos que os atletas participantes deste tipo de provas, tendo em conta a organização, tenham uma ingestão alimentar adequada. Na realidade, um aumento do consumo de alimentos ricos em precursores do óxido nítrico, como, por exemplo, os nitratos presentes na beterraba, poderá melhorar a vascularização do endotélio cérebro vascular e potencializar uma maior libertação de BDNF e, conseqüentemente, uma melhoria em todos os aspetos cognitivos quando conjuntamente tenhamos exercício de alta intensidade associado com stress oxidativo e níveis elevados de óxido nítrico (Domínguez *et al.*, 2017).

A nossa hipótese inicial seria de que os níveis de BDNF iriam aumentar substancialmente ao fim da TransPortugal, no entanto, e apesar de não se ter observado tal resultado, seja pela relação com a produção de plaquetas, seja pela inibição pelo HPA, a hipótese de Borror poderá ajudar a justificar os resultados, de acordo com o fluxo sanguíneo de cerebral (Figura 17).

O BDNF é libertado pelas células endoteliais microvasculares cerebrais e, por isso, um aumento do fluxo sanguíneo cerebral conjuntamente com o estresse oxidativo poderão ser responsáveis pelo aumento nos níveis de BDNF após o exercício. Segundo Borrer A. *et al.*, o fluxo sanguíneo cerebral pode diminuir durante exercícios de muito alta intensidade, comprometendo a produção de BDNF, tal como foi observado na nossa amostra. Desta forma, a otimização do fluxo sanguíneo cerebral poderá ser benéfica para estes atletas, como, por exemplo a adequação alimentar para melhorar esta via (Borrer, 2017).

Em resumo, neste capítulo testámos o impacto de uma prova intensa e de longa duração aos níveis neuromuscular, imune e de indicadores de stress. Imediatamente após a prova, os níveis de BDNF ou cortisol não estiveram correlacionados com a prova em questão. Apesar de serem nove dias consecutivos de prova, não conseguimos aferir com precisão o tempo de descanso dos atletas e a gestão de esforço que alguns atletas fizeram nas últimas etapas ou na última etapa.

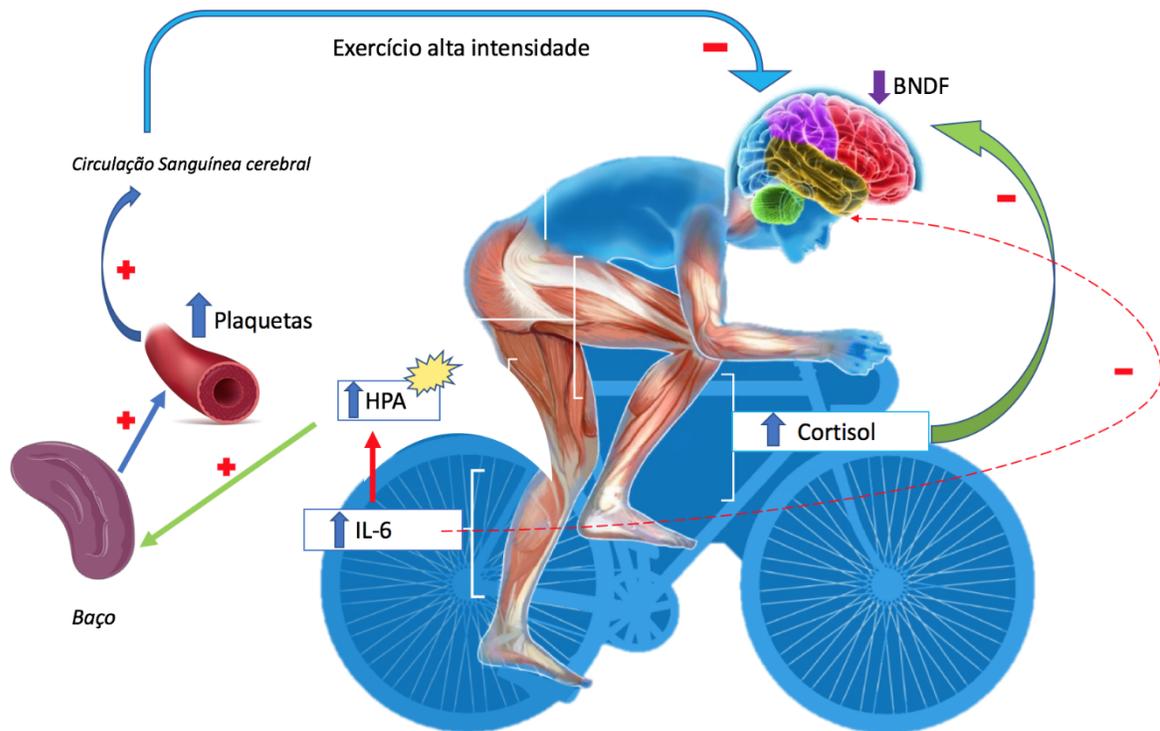


Figura 17: Esquema hipotético da interação músculo e sistema nervoso simpático.

CAPÍTULO V

- Conclusões -

5 CONCLUSÕES

As características da prova TransPortugal e o perfil não profissional dos participantes tornam este estudo único, refletindo os efeitos do exercício cumulativo e intenso a longo prazo em parâmetros hematológicos e bioquímicos da inflamação, ao mesmo tempo a variação genética pode ser parcialmente responsável pela variabilidade interindividual destes efeitos.

Os resultados encontrados permitiram concluir que, do ponto de vista da composição corporal, existe uma tendência de perda de peso corporal, perdendo mais peso as mulheres do que os homens, provavelmente à custa do tecido adiposo. Por ser uma prova com etapas, todas as mulheres, apesar de estarem em número reduzido, terminaram todas as etapas e ficaram classificadas dentro do grupo dos atletas rápidos, o que demonstra que as diferenças entre os sexos tendem a ser menos expressivas entre os desportistas com idades superiores aos 40 anos, submetidos a provas de longa duração. Os atletas que concluíram as nove etapas, curiosamente, apresentaram-se no início da prova com menos tecido mole magro e água corporal total comparativamente ao grupo que não terminou todas as etapas. Os atletas mais lentos eram mais velhos e com uma percentagem de massa gorda superior.

Ao nível do estado nutricional, o aporte nutricional em macronutrientes é reduzido, sobretudo em proteínas e nos hidratos de carbono, de acordo com a avaliação do Questionário de Frequência Alimentar. Dado o tipo de exercício desempenhado e a exigência da prova, o consumo de hidratos de carbono e proteínas poderia ter sido superior, garantindo um melhor desempenho ou mesmo atenuando a fadiga associada a este tipo de provas. Em relação aos micronutrientes, é importante melhorar e incentivar o consumo de vitamina K, de vitamina D e de biotina. O exercício repetitivo e intenso causa inflamação e pode originar hemólise, afetando a resposta inflamatória e alterando a resposta imunológica perante estes estímulos, em que os fatores nutricionais podem representar algumas limitações e propiciar uma melhoria na resposta frente às adversidades do exercício exaustivo de longa duração.

Nutrientes como o cálcio, a vitamina D e a vitamina K estão intimamente ligados a uma adequada resposta orgânica na remodelação e no metabolismo ósseo. Estes nutrientes apresentem em alguns casos uma ingestão inadequada.

O treino destes atletas considerados não profissionais é mais limitado em quantidade de tempo, quando se pensa num atleta profissional, mas dentro do universo estudado a grande maioria apresentava horas de treino relativamente equiparadas entre todos, com mais tempo de dedicação nos últimos dois meses prévios à prova, com aumento substancial no volume do treino.

Os resultados apresentados aqui identificam um modelo regulatório complexo para controlar as lesões induzidas pelo exercício. Embora apresentemos resultados de um modelo de exercício único numa amostra representativa de participantes de ultramaratona de ciclismo de montanha, outros marcadores inflamatórios certamente adicionarão uma visão mecanicista para a regulação da complexidade associada a exercícios de resistência.

Mais ainda no ciclismo de montanha, diferentemente do ciclismo de estrada, o impacto recorrente numa diversidade de terrenos que são por vezes superfícies duras submete o organismo a um impacto importante sobretudo nos membros inferiores, coluna e braços, capaz de induzir hemólise, com alteração nas transaminases hepáticas; além de ter uma resposta inflamatória importante com aumento considerável da proteína C reativa, leucocitose e linfocitopenia. Esses resultados devem ser levados em consideração ao analisarem-se os efeitos cumulativos do exercício físico extremo. Estudos adicionais focados nas vias de catabolismo da hemoglobina associadas ao exercício em resposta a outros tipos de exercício são justificados.

Por de trás desta variabilidade de resposta dos parâmetros bioquímicos poderão estar determinadas variantes genéticas. Desta forma, foram analisadas algumas variantes genéticas associadas com a resposta endócrina-metabólica e inflamatória de fase aguda.

Na primeira linha de resposta, o polimorfismo genético funcional da hemoxigenase (*HMOX1*), nomeadamente o genótipo AA, esteve associado a uma maior resposta nos linfócitos o que se traduz numa melhor adaptação dos atletas. Os atletas portadores

do fenótipo da Haptoglobina *HP 2.2* também tiveram uma melhor resposta em relação aos outros fenótipos, apresentando um efeito protetor frente ao desgaste do exercício extremo.

Ao nível da resposta metabólica, os portadores do alelo A do polimorfismo da Leptina (*LEP*) apresentaram um melhor desempenho durante a corrida. Considerando o polimorfismo do *ADRB2*, os portadores do alelo G apresentaram valores inferiores em relação aos parâmetros da insulina e do HOMA, o que poderia ser benéfico resultando num melhor metabolismo da gliconeogénese. Recentemente novos dados têm refletido o papel da osteocalcina, uma proteína do osso, no controlo metabólico. Na prova da TransPortugal, tal como em provas extenuantes e de longa duração, o controlo metabólico poderá ser um bom indicador de um melhor desempenho. Apesar de as determinações da osteocalcina não terem sido discriminatórias do desempenho, verificamos que os portadores do alelo C do polimorfismo da *BGLAP* apresentaram uma melhor resposta nos níveis da Osteocalcina-Gla, que atua de forma positiva sobre o metabolismo da glicose ao nível do osso.

Sobre a influência do exercício extremo em relação à resposta do BDNF, apesar de não se ter observado um aumento deste parâmetro depois da prova, observámos valores elevados nos atletas que terminaram todas as etapas, e desta forma poderíamos sugerir, de acordo com as investigações recentes, que o BDNF poderia melhorar os níveis de concentração e foco; tão necessários neste tipo de atividade física. São necessários muitos mais estudos em relação ao BDNF para efetivamente alegar a influência do exercício extremo sobre este marcador específico.

As conclusões das pesquisas atuais aumentam a nossa compreensão sobre como os seres humanos manipulam e se adaptam à toxicidade dos metabólitos produzidos durante um exercício físico cumulativo e altamente exigente.

Embora a literatura científica neste campo esteja em crescimento, mais estudos são necessários sobre o sistema ósseo-metabólico integrado.

Levando em consideração todos estes achados, levantamos a hipótese de que a recuperação óssea não é o enfoque principal no exercício extenuante a longo prazo, não obstante, o balanço do perfil metabólico poderá ser modulado por fatores que se repercutem em biomarcadores envolvendo não só a massa muscular esquelética mas também o metabolismo ósseo.

O exercício exaustivo e prolongado tem fatores bastante adversos e negativos, no entanto levanta-se a hipótese de que poderia ser modulada a resposta a este estímulo e ao impacto que este tipo de atividade pode causar, através da modificação e manipulação de aspetos nutricionais, biomecânicos e na adaptação do exercício ou no treino com o objetivo de contrariar ou minorar alguns dos efeitos negativos do exercício exaustivo e prolongado. Uma vez que este tipo de exercícios que leva os indivíduos a testarem os seus limites físicos e psicológicos tem estado em voga atualmente, sendo cada vez mais competitivos e envolvendo um número cada vez maior de atletas não profissionais, todo e qualquer esforço na tentativa de procurar a redução dos efeitos colaterais que o exercício extremo pode causar é extremamente necessário e benévolo com o objetivo de priorizar a segurança do atleta e prevenir condições que, todavia, a longo prazo, não são totalmente conhecidas.

CAPÍTULO VI

- *Perspetivas Futuras* -

6 PERSPETIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados neste trabalho preveem que a prática de exercício físico deverá ser equilibrada e sobretudo tentar controlar variáveis que dependem do próprio atleta, nomeadamente a preparação física e equilíbrio nutricional. No entanto, será uma mais valia aprofundar outras variáveis que não foram possíveis considerar no presente estudo.

Do ponto de vista do ecossistema no microbiota humano, e mesmo considerando que tal não foi tratado no presente trabalho, o exercício exaustivo de longa duração atua de forma negativa sobre o intestino, principalmente pelo aumento da circulação sanguínea inerente à atividade, que acarreta uma menor perfusão sanguínea no intestino, podendo lesar as células intestinais. São habituais a isquemia intestinal e a desidratação que podem ser expressas por alterações do trânsito intestinal, como a diarreia, que pode ocorrer acompanhada de sangue. O mecanismo em causa poderá ser resultante da fosforilação de proteínas de junção intercelular que, estando afetadas, resultam numa maior permeabilidade da barreira intestinal, e que podem dar lugar à translocação de endotoxinas, agravando o quadro de desconforto e diarreia (O'Sullivan *et al.*, 2015). Estas condições podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de doença inflamatória intestinal, que pode possivelmente ser manipulada em função das modificações do microbiota através de uma nutrição adequada a este fim.

A osteocalcina influencia as funções do SNC, uma vez que seus recetores foram identificados no cérebro. Estudos futuros poderão fornecer uma visão sobre a resposta do desempenho cognitivo no exercício extenuante a longo prazo associado aos efeitos da osteocalcina ao nível do SNC.

Por fim, pretendemos, numa próxima corrida da TransPortugal, estudar e aprofundar de que forma a capacidade cognitiva e de neuroplasticidade poderá influenciar positivamente o controlo da fadiga central que é cada vez mais uma preocupação dos atletas que competem neste tipo de provas, extenuantes e de longa duração. Por outro lado, será possível comparar estes atletas da TransPortugal com atletas federados de uma escola de ciclismo (n=70), o que poderá servir de controlo tanto para um estudo genético (estudo caso-controlo) como para o perfil bioquímico

associado. Cada vez mais são necessários estudos que comparem diferentes tipos de exercícios, de forma a se identificar o ponto de equilíbrio para cada atleta individualmente.

Pretende-se enfatizar ainda os parâmetros que possam ser relevantes para elucidar as adaptações e modificações que possam ser feitas a título de prevenção e na procura dos benefícios que podem advir do exercício exaustivo de longa duração.

CAPÍTULO VII
- Referências Bibliográficas -

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

Akimoto, A. K., Miranda-Vilela, A. L., Alves, P. C. Z., Pereira, L. C. d. S., Lordelo, G. S., Hiragi, C. d. O., Klautau-Guimarães, M. d. N. (2010). "Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage". *Free Radical Research*, 44(3), 322-331. doi:10.3109/10715760903494176.

Alayash, A. I. (2011). "Haptoglobin: old protein with new functions". *Clin Chim Acta*, 412(7-8), 493-498. doi:10.1016/j.cca.2010.12.011.

Alis, R., Sanchis-Gomar, F., Primo-Carrau, C., Lozano-Calve, S., Dipalo, M., Aloe, R., Lippi, G. (2015). "Hemoconcentration induced by exercise: Revisiting the Dill and Costill equation". *Scand J Med Sci Sports*, 25(6), e630-637. doi:10.1111/sms.12393.

Alonso, I., Matos, A., Ribeiro, R., Gil, A., Cardoso, C., Sardinha, L. B., & Bicho, M. (2017). "Mountain Cycling Ultramarathon Impacts in Inflammatory and Hemoglobin Responses". *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001440>.

Andreoli, A., Monteleone, M., Van Loan, M., Promenzio, L., Tarantino, U., & De Lorenzo, A. (2001). "Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes". *Med Sci Sports Exerc*, 33(4), 507-511.

Antonio, J., Ellerbroek, A., Silver, T., Vargas, L., & Peacock, C. (2016). "The effects of a high protein diet on indices of health and body composition – a crossover trial in resistance-trained men". *J Int Soc Sports Nutr*, 13, 3. doi:10.1186/s12970-016-0114-2.

Arakawa, K., Hosono, A., Shibata, K., Ghadimi, R., Fuku, M., Goto, C., Tokudome, S. (2016). "Changes in blood biochemical markers before, during, and after a 2-day ultramarathon". *Open Access Journal of Sports Medicine*, 7, 43-50.

doi:10.2147/OAJSM.S97468.

Armstrong, L. E., Johnson, E. C., McKenzie, A. L., Ellis, L. A., & Williamson, K. H. (2016). "Endurance Cyclist Fluid Intake, Hydration Status, Thirst, and Thermal Sensations: Gender Differences". *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 26(2), 161-167. doi:10.1123/ijnsnem.2015-0188

Association, W. M. Declaration of Helsinki – ethical principles for medical research involving human subjects. Retrieved from <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06d0331/06D-0331-EC20-Attach-1.pdf>.

Avolio, G. e. a. (2008). “The role of vitamin D3 and osteocalcin in the bone metabolism: a necessary analysis to optimize the osteointegrationien”. *J. Health Sci. Inst*, 26(3), 347-350.

B

Banzet, S., Koulmann, N., Simler, N., Sanchez, H., Chapot, R., Serrurier, B., Bigard, X. (2009). “Control of gluconeogenic genes during intense/prolonged exercise: hormone-independent effect of muscle-derived IL-6 on hepatic tissue and PEPCK mRNA”. *J Appl Physiol* (1985), 107(6), 1830-1839. doi:10.1152/jappphysiol.00739.2009.

Bell, P. G., Furber, M. J., KA, V. A. N. S., Anton-Solanas, A., & Swart, J. (2017). “The Physiological Profile of a Multiple Tour de France Winning Cyclist”. *Med Sci Sports Exerc*, 49(1), 115-123. doi:10.1249/mss.0000000000001068.

Bherer, L., Erickson, K. I., & Liu-Ambrose, T. (2013). “A Review of the Effects of Physical Activity and Exercise on Cognitive and Brain Functions in Older Adults”. *Journal of Aging Research*, 2013, 8. doi:10.1155/2013/657508.

Bird, S. R., Linden, M., & Hawley, J. A. (2013). “Acute changes to biomarkers as a consequence of prolonged strenuous running”. *Annals of Clinical Biochemistry*, 51(2), 137-150. doi:10.1177/0004563213492147.

Bland, J. M., & Altman, D. G. (1986). “Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement”. *Lancet*, 1(8476), 307-310.

Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). “Measuring agreement in method comparison studies”. *Stat Methods Med Res*, 8(2), 135-160. doi:10.1177/096228029900800204.

Bode, J. G., Albrecht, U., Haussinger, D., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (2012). “Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling”. *Eur J Cell Biol*, 91(6-7), 496-505. doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.008.

Boettger, L. M., Salem, R. M., Handsaker, R. E., Peloso, G. M., Kathiresan, S., Hirschhorn, J. N., & McCarroll, S. A. (2016). "Recurring exon deletions in the HP (haptoglobin) gene contribute to lower blood cholesterol levels". *Nat Genet*, 48(4), 359-366. doi:10.1038/ng.3510.

Borror, A. (2017). "Brain-derived neurotrophic factor mediates cognitive improvements following acute exercise". *Medical Hypotheses*, 106, 1–5.

<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.06.024>.

Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Spiegelman, B. M. (2012). "A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis". *Nature*, 481(7382), 463-468. doi:10.1038/nature10777.

Brooks, D. N. (1989). "The effect of attitude on benefit obtained from hearing aids". *Br J Audiol*, 23(1), 3-11.

Brotto, M., & Johnson, M. L. (2014). "Endocrine Crosstalk Between Muscle and Bone". *Current osteoporosis reports*, 12(2), 135-141. doi:10.1007/s11914-014-0209-0.

Buehler, P. W., Abraham, B., Vallelian, F., Linnemayr, C., Pereira, C. P., Cipollo, J. F., Schaer, D. J. (2009). "Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification". *Blood*, 113(11), 2578-2586. doi:10.1182/blood-2008-08-174466.

C

C., L. (2000a). "Reprodutibilidade e Validação de um questionário semiquantitativo de frequência alimentar". In *Alimentação e enfarte agudo do miocárdio: um estudo caso-controlo de base populacional* (Tese de Doutorado), Universidade do Porto.

C., L. (2000b). "Reprodutibilidade e Validação de um questionário semiquantitativo de frequência alimentar". In *Alimentação e enfarte agudo do miocárdio: um estudo caso-controlo de base populacional* (Tese de Doutorado), Universidade do Porto.

Cadore, E. L., Brentano, M. A., & Kruehl, L. F. M. (2005). "Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo". *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 11, 373-379.

Calder, P. C. (2013). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?" *Br J Clin Pharmacol*, 75(3), 645-662. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x.

Campos, J. C., Gomes, K. M., & Ferreira, J. C. (2013). "Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases". *Food Chem Toxicol*, 62, 107-119. doi:10.1016/j.fct.2013.08.035.

Caro, J., Navarro, I., Romero, P., Lorente, R. I., Priego, M. A., Martinez-Hervas, S., Ascaso, J. F. (2013). "Metabolic effects of regular physical exercise in healthy population". *Endocrinol Nutr*, 60(4), 167-172. doi: 10.1016/j.endonu.2012.11.004.

Chen, C.-Y., Hsieh, W.-L., Lin, P.-J., Chen, Y.-L., & Mao, S. J. T. (2011). "Haptoglobin is an Exercise-Responsive Acute-Phase Protein. In Acute Phase Proteins – Regulation and Functions of Acute Phase Proteins (1th ed.): InTech.

Chen, J., Li, K., Pang, Q., Yang, C., Zhang, H., Wu, F., Li, Y. (2016). Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis". *Sci Rep*, 6, 36347. doi:10.1038/srep36347.

Chevront, S. N., Carter, R., Deruisseau, K. C., & Moffatt, R. J. (2005). "Running performance differences between men and women: an update". *Sports Med*, 35(12), 1017-1024.

Chevion, S., Moran, D. S., Heled, Y., Shani, Y., Regev, G., Abbou, B., Epstein, Y. (2003). "Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5119-5123. doi:10.1073/pnas.0831097100.

Chiu, Y. H., Lai, J. I., Wang, S. H., How, C. K., Li, L. H., Kao, W. F., Chen, R. J. (2015). "Early changes of the anemia phenomenon in male 100-km ultramarathoners". *J Chin Med Assoc*, 78(2), 108-113. doi: 10.1016/j.jcma.2014.09.004.

Chlibkova, D., Knechtle, B., Rosemann, T., Zakovska, A., Tomaskova, I., Shortall, M., & Tomaskova, I. (2014). "Changes in foot volume, body composition, and hydration status in male and female 24-hour ultra-mountain bikers". *J Int Soc Sports Nutr*, 11(1), 12. doi:10.1186/1550-2783-11-12.

Chlíbková, D., Knechtle, B., Rosemann, T., Žákovská, A., Tomášková, I., Shortall, M., & Tomášková, I. (2014). "Changes in foot volume, body composition, and hydration status in male

and female 24-hour ultra-mountain bikers". *J Int Soc Sports Nutr*, 11, 12-12. doi:10.1186/1550-2783-11-12.

Cianferotti, L., & Brandi, M. L. (2014). "Muscle-bone interactions: basic and clinical aspects". *Endocrine*, 45(2), 165-177. doi:10.1007/s12020-013-0026-8.

Clarke, S. F., Murphy, E. F., O'Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A. Cotter, P. D. (2014). "Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity". *Gut*, 63(12), 1913-1920. doi:10.1136/gutjnl-2013-306541.

Comassi, M., Vitolo, E., Pratali, L., Del Turco, S., Dellanoce, C., Rossi, C., Solini, A. (2015). "Acute effects of different degrees of ultra-endurance exercise on systemic inflammatory responses". *Intern Med J*, 45(1), 74-79. doi:10.1111/imj.12625.

Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L.-A. (2007). "Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation". *Trends in Neurosciences*, 30(9), 464-472. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.011>.

D

Dahlquist, D. T., Stellingwerff, T., Dieter, B. P., McKenzie, D. C., & Koehle, M. S. (2017). "Effects of macro- and micronutrients on exercise-induced hepcidin response in highly trained endurance athletes". *Appl Physiol Nutr Metab*, 1-8. doi:10.1139/apnm-2017-0207.

De Paz, J. A., Villa, J. G., Lopez, P., & Gonzalez-Gallego, J. (1995). "Effects of long-distance running on serum bilirubin". *Med Sci Sports Exerc*, 27(12), 1590-1594.

Deurenberg, P., Yap, M., & van Staveren, W. A. (1998). "Body mass index and percent body fat: a meta-analysis among different ethnic groups". *Int J Obes Relat Metab Disord*, 22(12), 1164-1171.

Di Raimondo, D., Tuttolomondo, A., Butta, C., Casuccio, A., Giarrusso, L., Miceli, G., Pinto, A. (2013). "Metabolic and anti-inflammatory effects of a home-based programme of aerobic physical exercise". *Int J Clin Pract*, 67(12), 1247-1253. doi:10.1111/ijcp.12269.

Dill, D. B., & Costill, D. L. (1974). "Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration". *J Appl Physiol*, 37(2), 247-248.

Domínguez, R., Cuenca, E., Maté-Muñoz, J. L., García-Fernández, P., Serra-Paya, N., Estevan, M. C. L., ... Garnacho-Castaño, M. V. (2017, January). "Effects of Beetroot Juice Supplementation on Cardiorespiratory Endurance in Athletes. A Systematic Review". *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu9010043>.

Duclos, M., & Tabarin, A. (2016). "Exercise and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis". *Frontiers of Hormone Research*, 47, 12–26. <https://doi.org/10.1159/000445149>.

E

Ebrahim, S., & Davey Smith, G. (2008). "Mendelian randomization: can genetic epidemiology help redress the failures of observational epidemiology?" *Hum Genet*, 123(1), 15-33. doi:10.1007/s00439-007-0448-6.

Eynon, N., Ruiz, J. R., Meckel, Y., Santiago, C., Fiuza-Luces, C., Gomez-Gallego, F., Lucia, A. (2011). "Is the -174 C/G polymorphism of the IL6 gene associated with elite power performance? A replication study with two different Caucasian cohorts". *Exp Physiol*, 96(2), 156-162. doi:10.1113/expphysiol.2010.055442.

F

Fischer, C. P. (2006). "Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?" *Exerc Immunol Rev*, 12, 6-33.

Fuqua, J. S., & Rogol, A. D. (2013). "Neuroendocrine alterations in the exercising human: implications for energy homeostasis." *Metabolism*, 62(7), 911-921. doi:10.1016/j.metabol.2013.01.016.

G

Gallagher, D., Visser, M., Sepulveda, D., Pierson, R. N., Harris, T., & Heymsfield, S. B. (1996). "How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups?" *Am J Epidemiol*, 143(3), 228-239.

Gibney, S. M., McGuinness, B., Prendergast, C., Harkin, A., & Connor, T. J. (2013). "Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression." *Brain Behav Immun*, 28, 170-181. doi: 10.1016/j.bbi.2012.11.010.

Gleeson, M. (2007). "Immune function in sport and exercise". *J Appl Physiol*, 103(2), 693-699. doi:10.1152/jappphysiol.00008.2007.

Goldenstein, H., Levy, N. S., & Levy, A. P. (2012). "Haptoglobin genotype and its role in determining heme-iron mediated vascular disease". *Pharmacol Res*, 66(1), 1-6. doi: 10.1016/j.phrs.2012.02.011.

Gomez-Pinilla, F., & Hillman, C. (2013). "The influence of exercise on cognitive abilities". *Comprehensive Physiology*, 3(1), 403–428. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110063>.

Gonzalez, J. T., Fuchs, C. J., Betts, J. A., & van Loon, L. J. (2016). "Liver glycogen metabolism during and after prolonged endurance-type exercise". *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 311(3), E543-553. doi:10.1152/ajpendo.00232.2016.

Guillaume, G., Chappard, D., & Audran, M. (2012). « Evaluation of the bone status in high-level cyclists". *Journal of Clinical Densitometry: The Official Journal of the International Society for Clinical Densitometry*, 15(1), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2011.08.001>.

H

Harris, J. A., & Benedict, F. G. (1918). "A Biometric Study of Human Basal Metabolism". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 4(12), 370-373.

Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J., & Zierath, J. R. (2014). "Integrative Biology of Exercise". *Cell*, 159(4), 738-749. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.029.

Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). "The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism". *Trends Biochem Sci*, 39(4), 199-218. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.

He, Z., Hu, Y., Feng, L., Lu, Y., Bao, D., Xi, Y., Lucia, A. (2008). "Association between HMOX-1 genotype and cardiac function during exercise". *Appl Physiol Nutr Metab*, 33(3), 450-460. doi:10.1139/h08-016.

Heber, S., & Volf, I. (2015). "Effects of Physical (In)activity on Platelet Function". *BioMed Research International*, 2015, 165078. <https://doi.org/10.1155/2015/165078>.

Helge, J. W. (2017). "A high carbohydrate diet remains the evidence based choice for elite athletes to optimise performance". *J Physiol*, 595(9), 2775-2775. doi:10.1113/JP273830.

Hermansen, L., Hultman, E., & Saltin, B. (1967). "Muscle glycogen during prolonged severe exercise". *Acta Physiol Scand*, 71(2), 129-139. doi:10.1111/j.1748-1716.1967.tb03719.x.

Hodgdon, J. A., Friedl, K. E., Beckett, M. B., Westphal, K. A., & Shippee, R. L. (1996). "Use of bioelectrical impedance analysis measurements as predictors of physical performance". *Am J Clin Nutr*, 64(3 Suppl), 463s-468s.

Hoffman, M. D., & Krishnan, E. (2013). "Exercise Habits of Ultramarathon Runners: Baseline Findings from the ULTRA Study". *J Strength Cond Res*. doi:10.1519/JSC.0b013e3182a1f261.

Huang, T., Larsen, K. T., Ried-Larsen, M., Moller, N. C., & Andersen, L. B. (2014). "The effects of physical activity and exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy humans: A review". *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/sms.12069>.

Hull, T. D., Agarwal, A., & George, J. F. (2014). "The mononuclear phagocyte system in homeostasis and disease: a role for heme oxygenase-1". *Antioxid Redox Signal*, 20(11), 1770-1788. doi:10.1089/ars.2013.5673.

I

Ieraci, A., Mallei, A., Musazzi, L., & Popoli, M. (2015). « Physical exercise and acute restraint stress differentially modulate hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts and

epigenetic mechanisms in mice”. *Hippocampus*, 25(11), 1380–1392. <https://doi.org/10.1002/hipo.22458>.

Impellizzeri, F. M., & Marcora, S. M. (2007). “The physiology of mountain biking”. *Sports Med*, 37(1), 59-71.

Institute of Medicine (US). 2003. Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Planning Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes; Washington (DC): National Academies Press (US);

J

Jenkins, N. T., Landers, R. Q., Prior, S. J., Soni, N., Spangenburg, E. E., & Hagberg, J. M. (2011). “Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide and superoxide in circulating CD34(+) and CD34(-) cells”. *J Appl Physiol* (1985), 111(3), 929-937. doi:10.1152/jappphysiol.00541.2011.

Jensen, J., Jebens, E., Brennesvik, E. O., Ruzzin, J., Soos, M. A., Engebretsen, E. M., Whitehead, J. P. (2006). “Muscle glycogen inharmoniously regulates glycogen synthase activity, glucose uptake, and proximal insulin signaling”. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290(1), E154-e162. doi:10.1152/ajpendo.00330.2005.

Jensen, J., Rustad, P., Kolnes, A., & Lai, Y.-C. (2011). “The Role of Skeletal Muscle Glycogen Breakdown for Regulation of Insulin Sensitivity by Exercise”. *Front Physiol*, 2(112). doi:10.3389/fphys.2011.00112.

Jensen, T. E., Wojtaszewski, J. F., & Richter, E. A. (2009). “AMP-activated protein kinase in contraction regulation of skeletal muscle metabolism: necessary and/or sufficient?” *Acta Physiol (Oxf)*, 196(1), 155-174. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01979.x.

Jeon, Y. K., & Ha, C. H. (2015). “Expression of brain-derived neurotrophic factor, IGF-1 and cortisol elicited by regular aerobic exercise in adolescents”. *Journal of Physical Therapy Science*, 27(3), 737–741. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.737>.

Jeukendrup, A. E. (2011). “Nutrition for endurance sports: marathon, triathlon, and road cycling”. *J Sports Sci*, 29 Suppl 1, S91-99. doi:10.1080/02640414.2011.610348.

Jeukendrup, A. E., Craig, N. P., & Hawley, J. A. (2000). "The bioenergetics of World Class Cycling". *J Sci Med Sport*, 3(4), 414-433.

Johannesson, E., Simren, M., Strid, H., Bajor, A., & Sadik, R. (2011). "Physical activity improves symptoms in irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial". *Am J Gastroenterol*, 106(5), 915-922. doi:10.1038/ajg.2010.480.

Johnson, M. A. (2005). "Influence of vitamin K on anticoagulant therapy depends on vitamin K status and the source and chemical forms of vitamin K". *Nutr Rev*, 63(3), 91-97.

Joyner, M. J., & Coyle, E. F. (2008). "Endurance exercise performance: the physiology of champions". *J Physiol*, 586(1), 35-44. doi:10.1113/jphysiol.2007.143834.

K

Kanazawa, I. (2015). "Osteocalcin as a hormone regulating glucose metabolism". *World Journal of Diabetes*, 6(18), 1345-1354. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i18.1345>.

Karlsson, J., & Saltin, B. (1971). "Diet, muscle glycogen, and endurance performance". *J Appl Physiol*, 31(2), 203-206.

Karsenty, G., & Mera, P. (2017). "Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle". *Bone*. doi:10.1016/j.bone.2017.04.006.

Kasapis, C., & Thompson, P. D. (2005). "The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review". *J Am Coll Cardiol*, 45(10), 1563-1569. doi:10.1016/j.jacc.2004.12.077.

Kerr, D. A., Papalia, S., Morton, A., Dick, I., Dhaliwal, S., & Prince, R. L. (2007). "Bone mass in young women is dependent on lean body mass". *J Clin Densitom*, 10(3), 319-326. doi:10.1016/j.jocd.2007.05.001.

Kim, J. H., & Baggish, A. L. (2017). "Strenuous Exercise and Cardiovascular Disease Outcomes". *Curr Atheroscler Rep*, 19(1), 1. doi:10.1007/s11883-017-0636-3.

Kim, Y. N., Hwang, J. H., & Cho, Y. O. (2016). "The effects of exercise training and acute exercise duration on plasma folate and vitamin B12". *Nutr Res Pract*, 10(2), 161-166. doi:10.4162/nrp.2016.10.2.161.

Klack, K., & Carvalho, J. F. d. (2006). "Vitamina K: metabolismo, fontes e interação com o anticoagulante varfarina". *Revista Brasileira de Reumatologia*, 46, 398-406.

Knaepen, K., Goekint, M., Heyman, E. M., & Meeusen, R. (2010). "Neuroplasticity – exercise – induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects". *Sports Med*, 40(9), 765-801. doi:10.2165/11534530-000000000-00000.

Knechtle, B., Duff, B., Schulze, I., & Kohler, G. (2008). "A Multi-Stage Ultra-Endurance Run over 1,200 KM Leads to a Continuous Accumulation of Total Body Water". *Journal of Sports Science & Medicine*, 7(3), 357-364.

Knechtle, B., Wirth, A., Knechtle, P., Rosemann, T., Rust, C. A., & Bescos, R. (2011). "A comparison of fat mass and skeletal muscle mass estimation in male ultra-endurance athletes using bioelectrical impedance analysis and different anthropometric methods". *Nutr Hosp*, 26(6), 1420-1427. doi:10.1590/s0212-16112011000600032.

Kobayashi K. (1993). *Histoire du Velocipède de Drais à Michaux 1817-1870 – Mythes et Réalités*. Ed. L'Hartmann.

Kobayashi, Y., Nakatsuji, A., Aoi, W., Wada, S., Kuwahata, M., & Kido, Y. (2014). "Intense exercise increases protein oxidation in spleen and liver of mice". *Nutr Metab Insights*, 7, 1-6. doi:10.4137/nmi.s13668.

Kraemer, W. J., Fragala, M. S., Watson, G., Volek, J. S., Rubin, M. R., French, D. N., Evans, D. S. (2008). "Hormonal responses to a 160-km race across frozen Alaska". *Br J Sports Med*, 42(2), 116-120; discussion 120. doi:10.1136/bjism.2007.035535.

Kraemer, W. J., & Ratamess, N. A. (2005). "Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training". *Sports Medicine (Auckland, N. Z.)*, 35(4), 339-361.

Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., & Etherton, T. D. (2009). "Dietary reference intakes for DHA and EPA". *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 81(2-3), 99-104. doi:10.1016/j.plefa.2009.05.011

Kruger, K., & Mooren, F. C. (2014). "Exercise-induced leukocyte apoptosis". *Exerc Immunol Rev*, 20, 117-134.

L

Labronici, P. J., Blunck, S. S., Lana, F. R., Esteves, B. B., Franco, J. S., Fukuyama, J. M., & Pires, R. E. S. (2013). "Vitamin D and its relation to bone mineral density in postmenopause women". *Revista Brasileira de Ortopedia*, 48, 228-235.

Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I. (1991). "A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies". *Nucleic Acids Research*, 19(19), 5444.

Landis, R. C., Philippidis, P., Domin, J., Boyle, J. J., & Haskard, D. O. (2013). "Haptoglobin Genotype-Dependent Anti-Inflammatory Signaling in CD163(+) Macrophages". *Int J Inflamm*, 2013, 980327. doi:10.1155/2013/980327.

Langlois, M. R., & Delanghe, J. R. (1996). "Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans". *Clin Chem*, 42(10), 1589-1600.

Lepers, R., & Stapley, P. J. (2016). "Master Athletes Are Extending the Limits of Human Endurance". *Front Physiol*, 7(613). doi:10.3389/fphys.2016.00613.

Lesinski, M., Hortobágyi, T., Muehlbauer, T., Gollhofer, A., & Granacher, U. (2015). "Effects of Balance Training on Balance Performance in Healthy Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis". *Sports Med*, 45, 1721-1738. doi:10.1007/s40279-015-0375-y.

Levinger, I., Brennan-Speranza, T. C., Zulli, A., Parker, L., Lin, X., Lewis, J. R., & Yeap, B. B. (2017). "Multifaceted interaction of bone, muscle, lifestyle interventions and metabolic and cardiovascular disease: role of osteocalcin". *Osteoporos Int*, 28(8), 2265-2273. doi:10.1007/s00198-017-3994-3.

Lippi, G., Salvagno, G. L., Danese, E., Tarperi, C., Guidi, G. C., & Schena, F. (2014). "Variation of red blood cell distribution width and mean platelet volume after moderate endurance exercise". *Adv Hematol*, 2014, 192173. doi:10.1155/2014/192173.

Lohmann, T. G., Roche, A. F., & Martorell, R. (1988). *Anthropometric Standardization Reference Manual*. In 1th ed.

Lombardi, G., Lanteri, P., Graziani, R., Colombini, A., Banfi, G., & Corsetti, R. (2012). "Bone and energy metabolism parameters in professional cyclists during the Giro d'Italia 3-weeks stage race". *PLoS One*, 7(7), e42077. doi: 10.1371/journal.pone.0042077.

Lombardi, G., Sanchis-Gomar, F., Perego, S., Sansoni, V., & Banfi, G. (2016). Implications of exercise-induced adipo-myokines in bone metabolism. *Endocrine*, 54(2), 284–305. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0834-0>.

Lopes, C., Aro, A., Azevedo, A., Ramos, E., & Barros, H. (2007). “Intake and adipose tissue composition of fatty acids and risk of myocardial infarction in a male Portuguese community sample”. *J Am Diet Assoc*, 107(2), 276-286.

doi: 10.1016/j.jada.2006.11.008.

Luk, H. Y., Levitt, D. E., Lee, E. C., Ganio, M. S., McDermott, B. P., Kupchak, B. R., Vingren, J. L. (2016). “Pro-and anti-inflammatory cytokine responses to a 164-km road cycle ride in a hot environment”. *Eur J Appl Physiol*, 116(10), 2007-2015. doi:10.1007/s00421-016-3452-5.

Luk, H. Y., McKenzie, A. L., Duplanty, A. A., Budnar, R. G., Levitt, D., Fernandez, A., Vingren, J. L. (2016). “Leukocyte Subset Changes in Response to a 164-km Road Cycle Ride in a Hot Environment”. *Int J Exerc Sci*, 9(1), 34-46.

M

Ma, F., Yang, Y., Li, X., Zhou, F., Gao, C., Li, M., & Gao, L. (2013). “The association of sport performance with ACE and ACTN3 genetic polymorphisms: a systematic review and meta-analysis”. *PLoS One*, 8(1), e54685. doi: 10.1371/journal.pone.0054685.

Maes, M., Leonard, B. E., Myint, A. M., Kubera, M., & Verkerk, R. (2011). “The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression”. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(3), 702-721. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.12.017.

Mahon, E., Hackett, A., Stott, T., George, K., & Davies, I. (2014). “Macronutrient consumption prior to, and during, a mountain marathon”. *Am J Sports Sci*, 2. doi: 10.11648/j.ajss.20140201.12.

Mairböurl, H. (2013). "Red blood cells in sports: Effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells". *Front Physiol*, 4(332).

doi:10.3389/fphys.2013.00332.

Margonis, K., Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Kouretas, D. (2007). "Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis". *Free Radic Biol Med*, 43(6), 901-910. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.022.

Mastorakos, G., Pavlatou, M., Diamanti-Kandarakis, E., & Chrousos, G. P. (2005). "Exercise and the stress system". *Hormones (Athens)*, 4(2), 73-89.

Matos, A., Pereira da Silva, A., Clara Bicho, M., Afonso, C., Areias, M. J., Rebelo, I., & Bicho, M. (2014). "In women with previous pregnancy hypertension, levels of cardiovascular risk biomarkers may be modulated by haptoglobin polymorphism". *Obstet Gynecol Int*, 2014, 361727. doi:10.1155/2014/361727.

Mattson, M. P. (2012). "Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease". *Cell Metabolism*, 16(6), 706–722. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.012>.

Medicine, I. o. (2003). *Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Planning*. Washington, DC: The National Academies Press.

Meeusen, R., Watson, P., Hasegawa, H., Roelands, B., & Piacentini, M. F. (2007). "Brain neurotransmitters in fatigue and overtraining". *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme*, 32(5), 857-864. doi:10.1139/h07-080.

Mera, P., Laue, K., Ferron, M., Confavreux, C., Wei, J., Galan-Diez, M., Karsenty, G. (2016). "Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise". *Cell Metab*, 23(6), 1078-1092.

doi: 10.1016/j.cmet.2016.05.004.

Millet, G. Y. (2011). "Can neuromuscular fatigue explain running strategies and performance in ultra-marathons? the flush model". *Sports Med*, 41(6), 489-506. doi:10.2165/11588760-000000000-00000.

Moller, H. J. (2012). "Soluble CD163". *Scand J Clin Lab Invest*, 72(1), 1-13. doi:10.3109/00365513.2011.626868.

Moore, S. C., Lee, I. M., Weiderpass, E., Campbell, P. T., Sampson, J. N., Kitahara, C. M., Patel, A. V. (2016). "Association of Leisure-Time Physical Activity with Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults". *JAMA Intern Med*, 176(6), 816-825. doi:10.1001/jamainternmed.2016.1548.

Mori, M., Higuchi, K., Sakurai, A., Tabara, Y., Miki, T., & Nose, H. (2009). "Genetic basis of inter-individual variability in the effects of exercise on the alleviation of lifestyle-related diseases". *J Physiol*, 587(Pt 23), 5577-5584.

doi:10.1113/jphysiol.2009.179283.

Muller, N., & Schwarz, M. J. (2007). "Immunological aspects of depressive disorders". *Nervenarzt*, 78(11), 1261-1273. doi:10.1007/s00115-007-2311-3.

Murawska-Cialowicz, E., Wojna, J., & Zuwała-Jagiello, J. (2015). "Crossfit training changes brain-derived neurotrophic factor and irisin levels at rest, after wingate and progressive tests, and improves aerobic capacity and body composition of young physically active men and women". *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 66(6), 811–821.

N

Niemela, M., Kangastupa, P., Niemela, O., Bloigu, R., & Juvonen, T. (2016). "Acute Changes in Inflammatory Biomarker Levels in Recreational Runners Participating in a Marathon or Half-Marathon". *Sports Med Open*, 2(1), 21. doi:10.1186/s40798-016-0045-0.

Nimmo, M. A., Leggate, M., Viana, J. L., & King, J. A. (2013). "The effect of physical activity on mediators of inflammation". *Diabetes Obes Metab*, 15 Suppl 3, 51-60. doi:10.1111/dom.12156

Noakes, T. D. (2012). "Fatigue is a Brain-Derived Emotion that Regulates the Exercise Behavior to Ensure the Protection of Whole Body Homeostasis". *Front Physiol*, 3, 82. doi:10.3389/fphys.2012.00082

Nybo, L. (2003). "CNS fatigue and prolonged exercise: effect of glucose supplementation". *Med Sci Sports Exerc*, 35(4), 589-594.

doi: 10.1249/01.mss.0000058433.85789.66.

O

O'Sullivan, O., Cronin, O., Clarke, S. F., Murphy, E. F., Molloy, M. G., Shanahan, F., & Cotter, P. D. (2015). "Exercise and the microbiota". *Gut Microbes*, 6(2), 131-136. doi:10.1080/19490976.2015.1011875

Oldknow, K. J., MacRae, V. E., & Farquharson, C. (2015). "Endocrine role of bone: recent and emerging perspectives beyond osteocalcin". *The Journal of Endocrinology*, 225(1), R1-19. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0584>.

(de) Oliveira, E. P., & Burini, R. C. (2014). "Carbohydrate-dependent, exercise-induced gastrointestinal distress". *Nutrients*, 6(10), 4191-4199. doi:10.3390/nu6104191.

Ono, K., Goto, Y., Takagi, S., Baba, S., Tago, N., Nonogi, H., & Iwai, N. (2004). "A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese". *Atherosclerosis*, 173(2), 315-319. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2003.11.021

Ostrowski, K., Schjerling, P., & Pedersen, B. K. (2000). "Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise". *Eur J Appl Physiol*, 83(6), 512-515. doi:10.1007/s004210000312.

P

Paulin, S., Roberts, J., Roberts, M., & Davis, I. (2015). "A case study evaluation of competitors undertaking an Antarctic ultra-endurance event: nutrition, hydration and body composition variables". *Extrem Physiol Med*, 4. doi:10.1186/s13728-015-0022-0.

- Paulin, S., Roberts, J., Roberts, M., & Davis, I. (2015). "A case study evaluation of competitors undertaking an Antarctic ultra-endurance event: nutrition, hydration and body composition variables". *Extrem Physiol Med*, 4(1), 3. doi:10.1186/s13728-015-0022-0.
- Paulsen, G., Mikkelsen, U. R., Raastad, T., & Peake, J. M. (2012). "Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise?" *Exerc Immunol Rev*, 18, 42-97.
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). "Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ". *Nat Rev Endocrinol*, 8(8), 457-465. doi:10.1038/nrendo.2012.49.
- Pedersen, B. K., & Hoffman-Goetz, L. (2000). "Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation". *Physiol Rev*, 80(3), 1055-1081.
- Pedersen, M., Pedersen, K. K., Bruunsgaard, H., Krabbe, K. S., Thomsen, C., Faerch, K., Mortensen, E. L. (2012). "Cognitive functions in middle aged individuals are related to metabolic disturbances and aerobic capacity: a cross-sectional study". *PLoS One*, 7(12), e51132. doi:10.1371/journal.pone.0051132.
- Pfeiffer, B., Cotterill, A., Grathwohl, D., Stellingwerff, T., & Jeukendrup, A. E. (2009a). "The effect of carbohydrate gels on gastrointestinal tolerance during a 16-km run". *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 19. doi:10.1123/ijsnem.19.5.485
- Pfeiffer, B., Cotterill, A., Grathwohl, D., Stellingwerff, T., & Jeukendrup, A. E. (2009b). "The effect of carbohydrate gels on gastrointestinal tolerance during a 16-km run". *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 19(5), 485-503.
- Pfeiffer, B., Stellingwerff, T., Hodgson, A. B., Randell, R., Pottgen, K., Res, P., & Jeukendrup, A. E. (2012). "Nutritional intake and gastrointestinal problems during competitive endurance events". *Med Sci Sports Exerc*, 44(2), 344-351. doi:10.1249/MSS.0b013e31822dc809.
- Pfeiffer, B., Stellingwerff, T., Zaltas, E., & Jeukendrup, A. E. (2010). "CHO oxidation from a CHO gel compared with a drink during exercise." *Med Sci Sports Exerc*, 42. doi:10.1249/MSS.0b013e3181e0efe6.
- Piacentini, M. F., Witard, O. C., Tonoli, C., Jackman, S. R., Turner, J. E., Kies, A. K., Meeusen, R. (2016). "Effect of Intensive Training on Mood with No Effect on Brain-Derived Neurotrophic Factor". *Int J Sports Physiol Perform*, 11(6), 824-830. doi:10.1123/ijsp.2015-0279.

Potgieter, S. (2013). *Sport nutrition: A review of the latest guidelines for exercise and sport nutrition from the American College of Sport Nutrition, the International Olympic Committee and the International Society for Sports Nutrition* (Vol. 26).

Puthuchear, Z., Skipworth, J. R. A., Rawal, J., Loosemore, M., Van Someren, K., & Montgomery, H. E. (2011). "Genetic influences in sport and physical performance". *Sports Medicine* (Auckland, N.Z.), 41(10), 845–859. <https://doi.org/10.2165/11593200-000000000-00000>.

Q

Qaisiya, M., Coda Zabetta, C. D., Bellarosa, C., & Tiribelli, C. (2014). "Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway". *Cell Signal*, 26(3), 512-520. doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.029.

Quaye, I. K. (2008). "Haptoglobin, inflammation and disease". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102(8), 735-742. doi:10.1016/j.trstmh.2008.04.010.

R

Rassaf, T., Lauer, T., Heiss, C., Balzer, J., Mangold, S., Leyendecker, T., Kelm, M. (2007). "Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity". *Br J Sports Med*, 41(10), 669-673; discussion 673. doi:10.1136/bjism.2007.035758

Rethorst, C. D., Landers, D. M., Nagoshi, C. T., & Ross, J. T. (2011). "The association of 5-HTTLPR genotype and depressive symptoms is moderated by physical activity". *J Psychiatr Res*, 45(2), 185-189. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.05.007.

Ritz, P. (2000). Body water spaces and cellular hydration during healthy aging. *Ann N Y Acad Sci*, 904, 474-483.

Robach, P., Boisson, R. C., Vincent, L., Lundby, C., Moutereau, S., Gergele, L., Millet, G. Y. (2014). "Hemolysis induced by an extreme mountain ultra-marathon is not associated with a

decrease in total red blood cell volume”. *Scand J Med Sci Sports*, 24(1), 18-27. doi:10.1111/j.1600-0838.2012.01481.x.

Roberts, D. D. (1991). *Cycling History: Myths and Queries: John Pinkerton*.

Robsahm, T. E., Aagnes, B., Hjartaker, A., Langseth, H., Bray, F. I., & Larsen, I. K. (2013). “Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies”. *Eur J Cancer Prev*, 22(6), 492-505. doi:10.1097/CEJ.0b013e328360f434

Rojas Vega, S., Struder, H. K., Vera Wahrmann, B., Schmidt, A., Bloch, W., & Hollmann, W. (2006). “Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans”. *Brain Res*, 1121(1), 59-65. doi:10.1016/j.brainres.2006.08.105.

Rossi, L., & Tirapegui, J. (2001). “Comparação dos métodos de bioimpedância e equação de Faulkner para avaliação da composição corporal em desportistas”. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37(2), 137-142.

S

Sansoni, V., Vernillo, G., Perego, S., Barbuti, A., Merati, G., Schena, F., Lombardi, G. (2017). “Bone turnover response is linked to both acute and established metabolic changes in ultra-marathon runners”. *Endocrine*, 56(1), 196-204. doi:10.1007/s12020-016-1012-8.

Sarpeshkar, V., & Bentley, D. J. (2010). “Adrenergic-beta(2) receptor polymorphism and athletic performance”. *J Hum Genet*, 55(8), 479-485. doi:10.1038/jhg.2010.42.

Saucedo Marquez, C. M., Vanaudenaerde, B., Troosters, T., & Wenderoth, N. (2015). “High-intensity interval training evokes larger serum BDNF levels compared with intense continuous exercise”. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 119(12), 1363–1373. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00126.2015>.

Sawczuk, M., Maciejewska, A., Ciężczyk, P., & Eider, J. (2011). “The role of genetic research in sport”. *Science & Sports*, 26(5), 251-258.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scispo.2011.01.012>.

Scalzo, R. L., Peltonen, G. L., Giordano, G. R., Binns, S. E., Klochak, A. L., Paris, H. L., Bell, C. (2014). "Regulators of human white adipose browning: evidence for sympathetic control and sexual dimorphic responses to sprint interval training". *PLoS One*, 9(6), e90696. doi: 10.1371/journal.pone.0090696.

Shin, H., Liu, P.-Y., Panton, L. B., & Ilich, J. Z. (2014). "Physical Performance in Relation to Body Composition and Bone Mineral Density in Healthy, Overweight, and Obese Postmenopausal Women". *Journal of Geriatric Physical Therapy*, 37(1), 7-16. doi:10.1519/JPT.0b013e31828af203.

Shin, K.-A., Kim, A.-C., Kim, Y.-J., Lee, Y.-H., Shin, Y.-O., Kim, S.-H., Park, Y. (2012). "Effect of Ultra-marathon (308 km) Race on Bone Metabolism and Cartilage Damage Biomarkers". *Annals of Rehabilitation Medicine*, 36(1), 80-87.

doi:10.5535/arm.2012.36.1.80.

Shin, K.-A., Park, K. D., Ahn, J., Park, Y., & Kim, Y.-J. (2016). "Comparison of Changes in Biochemical Markers for Skeletal Muscles, Hepatic Metabolism, and Renal Function after Three Types of Long-distance Running: Observational Study". *Medicine*, 95(20), e3657. doi:10.1097/MD.0000000000003657.

Silva, F. O. C. d., & Macedo, D. V. (2011). "Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral". *Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano*, 13, 320-328.

Silverman, M. N., & Deuster, P. A. (2014). "Biological mechanisms underlying the role of physical fitness in health and resilience". *Interface Focus*, 4(5), 20140040. doi:10.1098/rsfs.2014.0040.

Simopoulos, A. P. (2007). "Omega-3 fatty acids and athletics". *Curr Sports Med Rep*, 6(4), 230-236.

Skriver, K., Roig, M., Lundbye-Jensen, J., Pingel, J., Helge, J. W., Kiens, B., & Nielsen, J. B. (2014). "Acute exercise improves motor memory: exploring potential biomarkers". *Neurobiol Learn Mem*, 116, 46-58. doi:10.1016/j.nlm.2014.08.004

Slater, B., Marchioni, D. L., & Fisberg, R. M. (2004). "Estimando a prevalência da ingestão inadequada de nutrientes". *Revista de Saúde Pública*, 38, 599-605.

Slater, B., Philippi, S. T., Marchioni, D. M. L., & Fisberg, R. M. (2003). "Validação de Questionários de Frequência Alimentar – QFA: considerações metodológicas". *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6, 200-208.

Sureda, A., Tauler, P., Aguiló, A., Cases, N., Fuentespina, E., Cordova, A., Pons, A. (2005). "Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise". *Free Radic Res*, 39(12), 1317-1324. doi:10.1080/10715760500177500.

Systems, R. (2015). Retrieved from <http://www.rjlsystems.com/>.

Szuhany, K. L., Bugatti, M., & Otto, M. W. (2015). "A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor". *J Psychiatr Res*, 60, 56-64. doi:10.1016/j.jpsychires.2014.10.003.

T

Taha, H., Skrzypek, K., Guevara, I., Nigisch, A., Mustafa, S., Grochot-Przeczek, A., Jozkowicz, A. (2010). "Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells: lesson from the promoter allelic variants". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(8), 1634-1641. doi:10.1161/atvbaha.110.207316

Tarnopolsky, M. (2004). "Protein requirements for endurance athletes". *Nutrition*, 20(7-8), 662-668. doi: 10.1016/j.nut.2004.04.008

Taylor, D. R., Drazen, J. M., Herbison, G. P., Yandava, C. N., Hancox, R. J., & Town, G. I. (2000). "Asthma exacerbations during long term beta agonist use: influence of beta(2) adrenoceptor polymorphism". *Thorax*, 55(9), 762-767.

Thomas, D. T., Erdman, K. A., & Burke, L. M. (2016a). "Position of the Academy of Nutrition and Dietetics, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance". *J Acad Nutr Diet*, 116(3), 501-528. doi:10.1016/j.jand.2015.12.006.

Thomas, D. T., Erdman, K. A., & Burke, L. M. (2016b). "Position of the academy of nutrition and dietetics, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: nutrition and athletic performance". *J Acad Nutr Diet*, 116. doi: 10.1016/j.jand.2015.12.006.

Thompson, F. E., Subar, A. F., Loria, C. M., Reedy, J. L., & Baranowski, T. (2010). "Need for technological innovation in dietary assessment". *J Am Diet Assoc*, 110(1), 48-51. doi: 10.1016/j.jada.2009.10.008.

Todd, J., Madigan, S., Pourshahidi, K., McSorley, E., Laird, E., Healy, M., & Magee, P. (2016). "Vitamin D Status and Supplementation Practices in Elite Irish Athletes: An Update from 2010/2011". *Nutrients*, 8(8). doi:10.3390/nu8080485.

Tozzi, L., Carballedo, A., Lavelle, G., Doolin, K., Doyle, M., Amico, F., Frodl, T. (2016). "Longitudinal functional connectivity changes correlate with mood improvement after regular exercise in a dose-dependent fashion". *Eur J Neurosci*, 43(8), 1089-1096. doi:10.1111/ejn.13222

Trushkin, E. V., Timofeeva, M. A., Sysoeva, O. V., Davydov, Y. I., Knicker, A., Struder, H., & Tonevitsky, A. G. (2011). "Association of SLC6A4 gene 5-HTTLPR polymorphism with parameters of simple and complex reaction times and critical flicker frequency threshold in athletes during exhaustive exercise". *Bull Exp Biol Med*, 150(4), 471-474.

U

Udina, M., Navines, R., Egmond, E., Oriolo, G., Langohr, K., Gimenez, D., Martin-Santos, R. (2016). "Glucocorticoid Receptors, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Serotonin and Dopamine Neurotransmission are Associated with Interferon-Induced Depression". *Int J Neuropsychopharmacol*, 19(4). doi:10.1093/ijnp/pyv135.

V

Vannucchi, H., & Marchini, J. (1996). "Avaliação do Estado Nutricional" (Vol. 29). *Semiologia Especializada*, Capítulo I. Ed Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP.

Verbickas, V., Baranauskiene, N., Eimantas, N., Kamandulis, S., Rutkauskas, S., Satkunskiene, D., Skurvydas, A. (2017). "Effect of sprint cycling and stretch-shortening cycle exercises on the neuromuscular, immune and stress indicators in young men". *Journal of*

Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society, 68(1), 125-132.

Voss, M. W., Erickson, K. I., Prakash, R. S., Chaddock, L., Kim, J. S., Alves, H., Kramer, A. F. (2013). "Neurobiological markers of exercise-related brain plasticity in older adults." *Brain, Behavior, and Immunity*, 28, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.10.021>.

W

W.H.O. (1995). WHO Expert Committee on Physical Status. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO expert committee., World Health Organization. 854.

Walsh, J. J., Bentley, R. F., Gurd, B. J., & Tschakovsky, M. E. (2017). "Short-Duration Maximal and Long-Duration Submaximal Effort Forearm Exercise Achieve Elevations in Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor". *Frontiers in Physiology*, Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.00746>.

Wang, D., Liu, X., & Qiao, D. (2012). "Modulatory effect of subthalamic nucleus on the development of fatigue during exhausting exercise: An in vivo electrophysiological and microdialysis study in rats". *Journal of Sports Science and Medicine*, 11(2), 286-293.

Warner, S. E., Shaw, J. M., & Dalsky, G. P. (2002). "Bone mineral density of competitive male mountain and road cyclists". *Bone*, 30(1), 281-286.

Wasson, J. H. (2014). "Regular Exercise Is Strongly Associated with Anticipated Success for Reducing Health Risks". *The Journal of Ambulatory Care Management*, 37(3), 273-276. doi:10.1097/01.JAC.0000450881.58195.6a.

Willems, A., Paulson, T. A. W., Keil, M., Brooke-Wavell, K., & Goosey-Tolfrey, V. L. (2015). "Dual-Energy X-Ray Absorptiometry, Skinfold Thickness, and Waist Circumference for Assessing Body Composition in Ambulant and Non-Ambulant Wheelchair Games Players". *Front Physiol*, 6(356). doi:10.3389/fphys.2015.00356.

Williamson, E. (2016). "Nutritional implications for ultra-endurance walking and running events". *Extrem Physiol Med*, 5(1), 13. doi:10.1186/s13728-016-0054-0

Witard, O. C., Jackman, S. R., Kies, A. K., Jeukendrup, A. E., & Tipton, K. D. (2011). "Effect of increased dietary protein on tolerance to intensified training". *Med Sci Sports Exerc*, 43(4), 598-607. doi:10.1249/MSS.0b013e3181f684c9.

Z

Zammattio, C., A. Marinoni and A. M. Brizio (1980). *The Bicycle. Leonardo the Scientist*. New York, MacGraw-Hill, Co.

Zanatta, L. C. B., Boguszewski, C. L., Borba, V. Z. C., & Kulak, C. A. M. (2014). "Osteocalcin, energy and glucose metabolism". *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 58, 444-451.

Zoladz, J. A., & Pilc, A. (2010). "The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies". *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 61(5), 533–541.

CAPÍTULO VIII

-Apêndices-

8 APÊNDICES



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FADIGA CENTRAL ASSOCIADA AO EXERCÍCIO EXTREMO
AVALIAÇÃO INTERINDIVIDUAL EM ULTRA-MARATONISTAS DE CICLISMO DE MONTANHA

QUESTIONARIO E RECOLHA DE DADOS

Data/date: ___/___/___ Raça/Color: _____
Nome/Name: _____ N° _____
Genero/Gender: ___M___F Idade/Age: _____
Profissão/ Profesion: _____
E-mail: _____

Antecedentes:

Fumante/ Smoker: S/Y N/N Quantos ao dia/ How many per day: _____
Sofre alguma doença/ health problems: _____

Medicamento/ Drugs: _____

Suplementos Alimentares/ Nutrition Supplements: _____

Vitaminas/ Vitamins: _____

Frequencia/frequency: _____

Minerais/ Minerals: _____

Frequencia/frequency: _____

Polivitaminico/ _____

Frequencia/frequency: _____

BCAA: _____

Recuperadores/Recovery: _____

Outros/others: _____

Antropometria:

Peso/ Weight: _____ Altura/Height: _____

Perímetro Cintura/ Waist Ratio: _____ Perímetro Anca/ Hip Ratio: _____

Tensão Arterial/ Arterial Pressure: _____/_____ mmHg

Obs: _____



DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Título do Projeto de Investigação de Tese de Doutoramento

Fadiga Central no Exercício Extremo - Avaliação em Ultra-maratonas

Objetivo do Estudo

O exercício físico extremo causa uma série de efeitos no organismo promovendo reações oxidativas significantes e a liberação de substâncias que trabalham na adaptação do organismo baixo uma situação estressante como é o desporto competitivo, e o fator mais limitante para qualquer desportista é a fadiga, que é o centro desta investigação. A avaliação dos parâmetros antropométricos, de composição corporal, de análise de vários polimorfismo genéticos relacionados ao exercício e aos neurotransmissores poderiam nos ajudar a entender mais sobre a fadiga central, o excesso de treinamento e suas consequências, tanto biológicas quanto psicológicas, já que competições extremas como esta, levam ao participante à exigências físicas e psicológicas raramente mensuráveis. Contudo este objetivo só será cumprido com a colaboração dos participantes, através de uma doação de amostras biológicas, que serão guardadas e processadas para a elaboração do projeto de Doutoramento.

Procedimento

No caso de concordar em participar neste projeto ser-lhe-á colhida uma amostra biológica, sangue e saliva ou esfregaço bucal. A amostra será preservada em condições apropriadas e tratadas conforme os exames determinados que podem ajudar a elucidar o tema da fadiga central. Uma parte da amostra será tratada por um laboratório normal com as análises normalmente pedidas para um check-up medico e a outra parte da amostra será tratada no laboratório de genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, onde se analisarão os Polimorfismos genéticos e outras variáveis necessárias ao desenvolvimento da tese.

A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador, tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração assim que achar conveniente, sem necessidade de justificação, somente será necessário manifestar por escrito sua intenção de interromper a colaboração.

Serão cumpridas todas as normas éticas aceites internacionalmente para o uso de material biológico para fins de investigação.

Identificação das amostras e confidencialidade

Após a colheita, as amostras serão identificadas e numeradas por códigos para facilitar o processo e manter a privacidade, já que os dados resultantes dos estudos realizados serão alvo de publicações de uma forma anónima e agregada, em termos de porcentagens, ou dados numéricos, nunca individualmente.

Os resultados das análises normais serão enviadas por correio eletrónico ou por correio normal a cada participante.

Tempo de Conservação

As amostras serão conservadas pelo período necessário para o desenvolvimento da tese, sob a responsabilidade da equipa ligada ao projeto e posteriormente eliminada, caso houver interesse de manter estas amostras por mais tempo para o desenvolvimento de mais estudos ser-lhe-a consultado.

Benefícios para os participantes

Esta é uma doação com objetivo de investigação científica, e apesar do carácter altruísta da doação, em contrapartida haverá a compensação de resultados das análises bioquímicas normais, que será a glicemia, insulina, perfil hepático, perfil lipídico, e hemograma. Além de que se algum dos estudos for relevante para a saúde e o desempenho do dador, este será informado, se esta for sua vontade expressa na declaração do consentimento informado. Entretanto, sua participação é de fundamental importancia para tratar de elucidar a fadiga e os fenômenos de treino excessivo, visto a dificuldade de avaliar estes fenômenos e na dificuldade de reunir individuos em provas épicas como a Trans-Portugal e sua transcendência à nível de informações bioquímicas mensuráveis e de difícil observação.

Riscos Previsíveis

Na maioria dos casos o risco e o desconforto são inexistentes ou mínimos e são inerentes ao procedimento em si.



DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Investigador: _____

Nome do dador: _____

Numero Dorsal: _____ Número Estudo: _____ Código: _____

Data da Colheita: _____

E-mail: _____

Endereço: _____

Eu, _____, portador do B.I./ cartão do cidadão _____, declaro ter tomado conhecimento e aceitar participar neste projeto, com o objetivo de contribuir para a investigação científica na área da Nutrição e do Desporto, como parte de um projeto de Tese de Doutoramento da Investigadora Isanete Alves de Alonso.

Aceito que minha amostra biológica seja utilizada em outros projetos de investigação que se beneficiem da avaliação do atleta em provas desportivas de importância como esta. Poderei revogar minha participação em qualquer altura, bastando uma comunicação por escrito, onde manifesto minha vontade.

Declaro que aceito participar, voluntariamente, neste estudo.

Data: _____

Assinatura do dador: _____

Discuti este estudo de investigação com o participante, utilizando uma linguagem compreensível e apropriada. Informei adequadamente sobre riscos e benefícios, considerando que o participante compreendeu minha explicação.

Data: _____

Investigador: _____

Assinatura: _____



STATEMENT OF INFORMED CONSENT

Title of Project Research PhD Thesis

Central fatigue in Exercise Extreme - Evaluation in Ultra-Marathons

Purpose of the Study

Exercise extreme cause a number of effects in the body by promoting oxidative reactions and significant release of substances that work on the adaptation of the organism under a stressful situation is as competitive sport, and the most limiting for any sportsman is fatigue, which is the center this investigation. The evaluation of anthropometric parameters, body composition analysis of several polymorphisms related to neurotransmitters and exercise could help us understand more about the central fatigue overtraining and its consequences, both biological and psychological, since extreme competitions like this , take the participant to the physical and psychological demands rarely measurable. But this goal can only be accomplished with the cooperation of the participants through a donation of biological samples, which will be stored and processed for the preparation of the PhD project.

Procedure

If you agree to participate in this project you will be harvested a biological sample, blood or saliva and buccal swabs. The sample will be preserved under appropriate conditions and treated according to certain tests that may help elucidate the issue of central fatigue. A portion of the sample is treated by a normal laboratory analysis usually applied for a medical check-up and the other part of the sample will be treated in the genetics laboratory of the Faculty of Medicine, University of Lisbon, where we examine the genetic and other variables Polimorfismos necessary for the development of the thesis.

The sample donation is voluntary and revocable, and the donor has the right to withdraw the sample and / or discontinue the collaboration so sees fit, without justification, you only need to express in writing their intention to discontinue the collaboration.

Will be fulfilled all internationally accepted ethical standards for the use of biological material for research purposes.

Identification of samples and confidentiality

After harvesting, the samples will be numbered and identified by codes to facilitate the process and maintain privacy, since the data resulting from the studies will be ripe for publications on an anonymous and aggregated in terms of percentages or numerical data, never individually.

The analysis results will be sent by regular mail or by regular mail to each participant.

Time Conservation

The samples will be kept for longer than is necessary for the development of the thesis, under the responsibility of the team attached to the project and subsequently eliminated if there is interest to keep these samples for more time to develop more studies to be consulted him



STATEMENT OF INFORMED CONSENT

Benefits for participants

This is a donation for the purpose of scientific research, and despite the character's altruistic donation, however there will be compensation for normal biochemical test results, which will be glucose, insulin, liver profile, lipid profile, and blood count. Besides that some of the studies relevant to the health and performance of the donor, he shall be informed if this is your intention expressed in the statement of informed consent. However, their participation is of fundamental importance to address elucidate the phenomena of fatigue and overtraining, since the difficulty of assessing these phenomena and the difficulty of gathering evidence on individuals as the epic Trans-Portugal and his transcendence to the level of biochemical information measurable and difficult to observe.

Foreseeable Risk

In most cases the risk and discomfort are absent or minimal and are related to the procedure itself.

Investigator: _____

Name donor: _____

Number: _____ **Number Study:** _____ **Código:** _____

Harvest Date: _____

E-mail: _____

Address: _____

I, _____, holder of ID card / cidadão _____ declare you have read and agree to participate in this project, with the aim of contributing to scientific research in the area of Nutrition and Sport as part of a PhD thesis project of Researcher Isanete Alves de Alonso. I accept that my biological sample is used in other research projects that benefit the evaluation of the athlete in sporting events of importance as this. Can I withdraw my participation at any time by written notice, which manifest my will. I declare that I agree to voluntarily participate in this study.

Date: _____

Signature of donor: _____

Discuss this research study with the participant, using a language understandable and appropriate. Adequately informed about risks and benefits, given that the participant understood my explanation.

Date: _____

Investigator: _____

Signature: _____

Questionário de Frequência Alimentar

Informações para preenchimento

Este questionário tem como objectivo avaliar a sua alimentação. Procure responder às questões de uma forma sincera, indicando aquilo que realmente come e não o que pensa que seria correcto comer.

O questionário pretende identificar o consumo de alimentos do ano anterior. Assim para cada alimento, deve assinalar, preenchendo o respectivo círculo, quantas vezes por dia, semana ou mês comeu em média cada um dos alimentos referidos nesta lista, ao longo do último ano. Não se esqueça de assinalar no círculo respectivo os alimentos que nunca come, ou come menos de 1 vez por mês.

Na coluna correspondente à quantidade assinale se a porção que habitualmente come é igual, maior ou menor do que a referida como porção média.

Para os alimentos que só são consumidos, em determinadas épocas do ano (por ex.: cerejas, diospiros, etc.), assinale as vezes em que o alimento foi consumido nessa época, e seleccione a opção na última coluna (Sazonal).

Se determinada frequência for superior a um mês, deve indicar a quantidade respectiva, caso contrário, assumir-se-á a porção média.

Não se esqueça de ter em conta as vezes que o alimento é consumido sozinho e aquelas em que é adicionado a outros alimentos ou pratos (ex.: café com leite, os ovos das omeletas, etc.).

No grupo III - Óleos e Gorduras - responda apenas ao que é adicionado em saladas, no prato, no pão, etc., e não à utilizada para cozinhar.

No grupo VI - Hortaliças e Legumes - responda pensando nos que são consumidos no prato (cozidos ou em saladas) e não nos que entram na confecção da sopa.

Tenha atenção para preencher todos as linhas, pois se não o fizer serão considerados os valores pré definidos -- Nunca ou <1 mês -- na parte da Frequência média e -- igual -- na parte da QUANTIDADE

I. PRODUTOS LÁCTEOS	Nunca ou <1mes	1-3/ mes	1x/ sem	2-4/mes	5-6/sem	1 X dia	2-3x/dia	4-5/dia	6+/dia	porção media	menor	igual	maior	sazonal
1. Leite Gordo										1 chav= 250ml				
2. Leite meio-gordo										1 chav= 250ml				
3. Leite Magro										1 chav= 250ml				
4. Iogurte										1un.= 125g				
5. Queijo curado, semi-curado ou cremoso										1fatia=30 g				
6. Sobremesas Lácteas										1 un ou 1 prato sobremesa				
7. Gelados										1un ou 2 bolas				
II. CARNES, OVOS, PEIXE	Nunca ou <1mes	1-3/ mes	1x/ sem	2-4/mes	5-6/sem	1 X dia	2-3x/dia	4-5/dia	6+/dia	porção media	menor	igual	maior	sazonal
8. Ovos										1un.				
9. Frango										2peças ou 1/4 fgo				
10. Peru; Coelho										1porção ou 2 peças				
11. Carne de Vaca, porco, cabrito como prato ppal.										1 porção=1 20g				
12. Fígado vaca, porco, frango										1 porção=1 20g				
13. língua, mão de vaca, tripas, chispe, coração, rins										1 porção =100g				
14. Fiambre, chouriço, salpicão, presunto, etc										2 -3 fatias				
15. Salsichas										3 un medias				
16. Toucinho, bacon										2 fatias				
17. Peixe gordo: sardinha, cavala, carapau, salmão, etc										1 porção = 125g				
18. Peixe magro: pescada, faneca, dourada, etc.										1 porção = 125g				
19. Bacalhau										1porção media				
20. Peixe em conserva: atum, sardinhas										1 lata				
21. Lulas, polvo										1 porção =100g				
22. camarão, almeijoas, mexilhao, etc										1 prato sobremesa				
III. ÓLEOS E GORDURAS	33	1-3/ mes	1x/ sem	2-4/mes	5-6/sem	1 X dia	2-3x/dia	4-5/dia	6+/dia	porção media	menor	igual	maior	sazonal
23. Azeite										1 colher sopa				
24. Óleos: girassol, soja, milho										1 colher sopa				
25. Margarina										1 colher cha				
26. Manteiga										1 colher cha				
IV. PÃES, CEREAIS E SIMILARES	Nunca ou <1mes	1-3/ mes	1x/ sem	2-4/mes	5-6/sem	1 X dia	2-3x/dia	4-5/dia	6+/dia	porção media	menor	igual	maior	sazonal
27. Pão branco, (tostas)										1 fatia ou 2 tostas				
28. Pão integral (tostas), centeio, mistura										1 fatia ou 2 tostas				

29. Broa, broa de avintes											1 fatia				
30. Flocos de cereais											1 chávena				
31. Arroz cozido											1/2 prato				
32. Massas. esparguete, macarrão cozidos											1/2 prato				
33. Batatas fritas caseiras											1/2 prato				
34. Batatas fritas de pacote											1 pac. peq				
35. Batatas cozidas, assadas, estufadas											2 un medias				
V. DOCES E PASTÉIS	Nunca ou <1mes	1-3/ mes	1x/ sem	2-4/mes	5-6/sem	1 X dia	2-3x/dia	4-5/dia	6+/dia	porção media	menor	igual	maior	sazonal	
36. Bolachas tipo Maria, água, sal e integrais											3 un medias				
37. Outras bolachas e biscoitos											3 un medias				
38. Croissant, pastéis, bolos caseiros											1 un ou 1 fatia				
39. Chocolate, tabletes ou pó											3 quadros ou 30g				
40. Snacks de Chocolate (mars, twix, kit kat, etc)											1 un				
41. Marmelada, compota, geléia e mel.											1 colher sobremesa				
42. Açúcar											1 colher sobremesa				
VI. HORTALIÇAS E LEGUMES	Nunca ou <1mes	1-3/ mes	1x/ sem	2-4/mes	5-6/sem	1 X dia	2-3x/dia	4-5/dia	6+/dia	porção media	menor	igual	maior	sazonal	
43. Couve branca, lombarda cozidas											1/2 chávena				
44. Penca tronchuda cozida											1/2 chávena				
45. Couve galega cozida											1/2 chávena				
46. Brócolos cozidos											1/2 chávena				
47. Couve-flor, couve de bruxelas											1/2 chávena				
48. Grelos, nabiças, espinafres cozidos											1/2 chávena				
49. Feijão verde cozido											1/2 chávena				
50. Alface, agrião, rúcula											1/2 chávena				
51. Cebola											1/2 un				
52. Cenoura											1 un media				
53. Nabo											1 un media				
54. Tomate fresco											3 fatias				
55. Pimento											6 fatias				
56. Pepino											1/4 un media				
57. Leguminosas cozidas: feijão, grão-de-bico											1 chávena				
58. Ervilhas, favas cozidas											1/2 chávena				
VII. FRUTAS	Nunca ou <1mes	1-3/ mes	1x/ sem	2-4/mes	5-6/sem	1 X dia	2-3x/dia	4-5/dia	6+/dia	porção media	menor	igual	maior	sazonal	
59. Maça, pera											1 un				
60. Laranja, tangerina											1un ou 2 un peq				

61. Banana										1 un media				
62. Kiwi										1 un media				
63. Morango										1 chávena				
64. Cereja										1 chávena				
65. Pessego, ameixa										1-2 un				
66. Melão, melancia										1 fatia				
67. Diospiro										1 un				
68. Figo fresco, nesperas, damascos										3 un medias				
69. Uvas frescas										1 cacho medio				
70. Frutos em conserva pessego e ananas										2 metades ou 2 rodela				
71. frutos secos: amendoas, avelãs, amendoins, caju, nozes, etc										1/2 chávena				
72. Azeitona										6 un				
VIII. BEBIDAS E MISCELANEAS	Nunca ou <1mes	1-3/ mes	1x/ sem	2-4/mes	5-6/sem	1 X dia	2-3x/dia	4-5/dia	6+/dia	porção media	menor	igual	maior	sazonal
73. Vinho										1 copo = 125 ml				
74. Cerveja										1 lata				
75. Bebidas brancas: whisky, aguardente, brandy, vodca										1 dose = 40 ml				
76. Coca-cola										1 lata ou garrafa				
77. Ice tea										1 lata ou garrafa				
78. Refrigerantes, sumos de fruta, néctares embalados										1 lata ou garrafa				
79. Café (incluindo o adicionado a outras bebidas)										1 chávena				
80. Chá preto e chá verde										1 chav= 250ml				
81. Croquetes, rissoles, etc										3 un				
82. Maionese										1 colher sobremesa				
83. Molho de tomate, catchup										1 colher sopa				
84. Pizza										1/2 un ou 3 fatias				
85. Hamburguer										1 un				
86. Sopa de Legumes										1 prato				

Food Frequency Questionnaire

Information regarding the questionnaire

This questionnaire aims to evaluate your eating habits. Try to answer the questions sincerely; indicating what you actually eat and not what you think you should eat.

The questionnaire aims to identify your food consumption last year. For each food, fill the appropriate square, showing how frequently each food was eaten, over the last year. Do not forget to tick the square corresponding to the foods which are never eaten or eaten less than once a month.

In the column corresponding to quantity, mark indicating if your portion is equal. More or less, than the average portion.

Foods that are only eaten only at certain times of the year (for eg: Cherries, persimmons, etc...) indicate the number of times that the fruit was consumed and select the option (seasonal) in the last column.

If the given frequency exceeds one month, the amount should be indicated thereof, otherwise it will be assumed that the portion is average.

Do not forget to take into account the number of times food is consumed by itself and those in which it is added to other foods and dishes (eg: coffee with milk, eggs in omelettes, etc).

In group III - Oils and fats - respond only to what is added to salads, on the plate, in bread and not use for cooking use.

In group IV - Vegetables and others - respond according to what is consumed in the dish (cooked or in salads) and not those in soup.

Please fill in all the lines, otherwise they will be considered predefined values - never or < 1 month - in the middle of the frequency and - equally - in part quantity.

I. DAIRY PRODUCTS	Never or <1mo	1-3/ mo	1x/week	2-4/ wk	5-6/wk	1 X day	2-3x/ day	4-5/ day	6+/ day	average portion	less	equal	more	seasonal
1. Fat Milk										1 cup= 250ml				
2. semi- skimmed milk										1 cup= 250ml				
3. slender milk										1 cup= 250ml				
4. yogurt										1un.= 125g				
5. cheese cured, cured or creamy										1slice=30g				
6. dessert										1 un or 1 plate				
7. Ice cream										1un or 2 balls				
II. MEATS, EGGS AND FISH	Never or <1mo	1-3/ mo	1x/week	2-4/ wk	5-6/wk	1 X day	2-3x/ day	4-5/ day	6+/ day	average portion	less	equal	more	seasonal
8. Eggs										1un.				
9. poultry										2pieces or 1/4				
10. turkey, rabbit										1 portion= 120g				
11. beef, pork, lamb as ppal dish										1portion= 120g				
12. liver - pork, chicken										1 portion = 100g				
13. thong, hands, heart, kidneys										1 portion= 120g				
14. Ham, sausages like chouriço										2 - 3 slices				
15. sausages										3 medium				
16. bacon										2 slices				
17. fatty fish: herring, salmon, etc										1portion= 125g				
18. lean fish: hake, tuna										1 portion= 120g				
19. Cod										1 un medium				
20. Tuna, sardines in can										1 can				
21. octopus, squid										1 portion= 120g				
22. shrimp, mussels, clams										1 plate				
III. OLIS AND FATS	Never or <1mo	1-3/ mo	1x/week	2-4/ wk	5-6/wk	1 X day	2-3x/ day	4-5/ day	6+/ day	average portion	less	equal	more	seasonal
23. Olive oil										1 spoon				

24. Sunflower, soybean, corn oils										1 spoon				
25. Margarine										1 tea spoon				
26. Butter										1 tea spoon				
IV. BREAD, CEREALS AND SIMILAR	Never or <1mo	1-3/ mo	1x/week	2-4/ wk	5-6/wk	1 X day	2-3x/ day	4-5/ day	6+/ day	average portion	less	equal	more	seasonal
27. White Bread (toast)										1 or 2 slices				
28. brown bread (toast), oat, mix cereal bread										1 or 2 slices				
29. Corn bread										80g				
30. Cereal flakes										1 cup				
31. rice cooked										1 cup				
32. Spaghetti, macaroni cooked										1 portion				
33. French fries potatoes homemade										1 portion				
34. potato chips										1 small pack				
35. baked roasted potato										2 med size				
V. SWEET AND PASTRIES	Never or <1mo	1-3/ mo	1x/week	2-4/ wk	5-6/wk	1 X day	2-3x/ day	4-5/ day	6+/ day	average portion	less	equal	more	seasonal
36. wafer type Maria, Soda biscuits										3 medium				
37. Others biscuits										3 medium				
38. croissants, pastries, homemade cakes										1 or 1slice				
39. Chocolate, tablets or powder										3 squares or 1 sp				
40. Snacks chocolate, Mars, Kit kat, Twix										1un				
41. Marmalade, jam, jelly and honey										1 tea spoon				
42. sugar										1 tea spoon				
VI. VEGETABLES	Never or <1mo	1-3/ mo	1x/week	2-4/ wk	5-6/wk	1 X day	2-3x/ day	4-5/ day	6+/ day	average portion	less	equal	more	seasonal
43. white cabbage coked										1/2 cup				
44. green cabbage cooked										1/2 cup				
45. Cooked galega cabbage										1/2 cup				
46. Broccoli cooked										1/2 cup				
47. Cauliflower, Brussels sprouts										1/2 cup				

48. Greens, spinach cooked										1/2 cup				
49. Green beans cooked										1/2 cup				
50. lettuce, arugula, watercress										1/2 cup				
51. onion										1/2 un				
52. carrots										1 un medium				
53. turnip										1 un medium				
54. Fresh Tomato										3 slices				
55. Pepper red or green										6 slices				
56. Cucumber										1/4 un med				
57. beans cooked										1/2 cup				
58. chick-peas, cooked										1/2 un				
VII. FRUITS	Never or <1mo	1-3/ mo	1x/week	2-4/ wk	5-6/wk	1 X day	2-3x/ day	4-5/ day	6+/ day	average portion	less	equal	more	seasonal
59. Apple, pear										1 un				
60. Orange, tangerine										1 or 2 un				
61. Banana										1 un medium				
62. Kiwi										1 un medium				
63. Strawberry										1 cup				
64. Cherry										1 cup				
65. Peach, plum										1 - 3 medium				
66. Melon, watermelon										1 slice				
67. persimmon										1un.				
68. Fresh figs, apricots										3 medium				
69. Fresh grapes										1 portion				
70. Pineapple, peach canned										2 slices				
71. Nuts: almonds, hazelnuts, peanuts, cashews, walnuts										1/2 cup				
72. olives										6 un				
VIII. DRINKS and MISCELLANEOUS	Never or <1mo	1-3/ mo	1x/week	2-4/ wk	5-6/wk	1 X day	2-3x/ day	4-5/ day	6+/ day	average portion	less	equal	more	seasonal
73. wine										1 glass				
74. beer										1 bottle				
75. whisky, rum, brandy, vodka, gin,										1 glass= 40ml				
76. Coke										1 bottle				
77. Ice tea										1 bottle				

78. Soft drinks, fruit juices										1 bottle				
79. Coffee (including added to other beverages)										1 cup				
80. Black tea, green tea										1 cup				
81. Croquettes, rissoles, snacks										3 un				
82. Mayonnaise										1 tea spoon				
83. Tomato sauce, ketchup										1 spoon				
84. Pizza										1/2 un or 3 slices				
85. Burger										1 un				
86. Vegetable soup										1 portion				

Manuscrito – Aceite para publicação na revista: *Medicine and Science in Sports and Exercise*

RE: MSSE-D-17-00433R2, "Mountain cycling ultra-marathon impacts in inflammatory and hemoglobin responses"

Dr. Alonso,

I am pleased to inform you that your work is accepted for publication in *Medicine & Science in Sports & Exercise*. Congratulations to you and your coauthors in meeting the standards required for publication in the journal.

****IMPORTANTLY**** Before final publication, line 162 in the manuscript (dealing with CD163 levels) must be altered to indicate no change in CD163 levels - the statistics are fine, but the verbiage seems to indicate a difference in levels (which is contradicted in the discussion).

Pending a final format check, all manuscript materials will be forwarded to the production staff for placement in an upcoming issue. In due course you will be receiving further information and instructions from the Editorial Office about any final procedures for preparing the manuscript for publication.

Please be aware that there is usually a delay of a few months before the article will appear in print, due to the high demand for space in the journal.

Open-Access Publication

If you indicated in the revision stage that you would like your submission, if accepted, to be made open access, please go directly to step 2. If you have not yet indicated that you would like your accepted article to be open access, please follow the steps below to complete the process:

1. Notify the journal office via email that you would like this article to be available open access. Please send your e-mail to kwilson@acsm.org. Please include your article title and manuscript number.
2. Submit a License to Publish (LTP) form. Please download the form from <http://links.lww.com/LWW-ES/A49>, sign it, and e-mail the completed form to the journal office.
3. Go to <http://wolterskluwer.qconnect.com> to pay for open access. The article processing charge for *Medicine & Science in Sports & Exercise* is \$3,200. The article processing charge for authors funded by the Research Councils UK (RCUK) is \$4,000. **If you have not previously used this site to place an order, you will need to register for an account (your login will be different from your Editorial Manager login). When placing your order, you will be asked for the following information. Please enter exactly as shown:**
 - a. Article Title - Mountain cycling ultra-marathon impacts in inflammatory and hemoglobin responses
 - b. Manuscript Number - MSSE-D-17-00433R2

Thank you for submitting this study to *Medicine & Science in Sports & Exercise* and best wishes for your future work.

Regards,

Dr. J. Timothy Lightfoot
Associate Editor
Medicine & Science in Sports & Exercise

Reviewer Comments:

Reviewer #1: No further comments.

Reviewer #2: Most of the specific comments have been addressed meeting the needed corrections. However the sentence in line 162 which was pointed out in the general comments has being incorrect, was not corrected according with the alteration introduced in line 262.

I still think the text would benefit from the correction of the English.

AQ1 Mountain Cycling Ultramarathon Effects on Inflammatory and Hemoglobin Responses

AQ2 ISANETE ALONSO^{1,2,3}, ANDREIA MATOS^{1,4}, RICARDO RIBEIRO^{1,5,6,7}, ÂNGELA GIL^{1,4}, CARLOS CARDOSO⁸, LUÍS B. SARDINHA⁹, and MANUEL BICHO^{1,4}

¹Laboratory of Genetics and Environmental Health Institute, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Lisbon, PORTUGAL; ²Department of Nutritional Science, Atlântica University, Barcarena, PORTUGAL; ³CESOB—Center for Studies in Social Sciences, Business, Health and Welfare, Atlântica University, Barcarena, PORTUGAL; ⁴Institute of Scientific Research Bento of Rocha Cabral, Lisbon, PORTUGAL; ⁵i3S, Institute for Research and Innovation in Health, University of Porto, Porto, PORTUGAL; ⁶INEB, Institute of Biomedical Engineering, University of Porto, Porto, PORTUGAL; ⁷Department of Clinical Pathology, The Coimbra Hospital and University Centre, Coimbra, PORTUGAL; ⁸Clinical Chemistry Laboratory, Miraflores, PORTUGAL; and ⁹Exercise and Health Laboratory, CIPER, Faculdade de Motricidade Humana, Universidade de Lisboa, Cruz Quebrada, Dafundo, PORTUGAL

ABSTRACT

AQ1

ALONSO, I., A. MATOS, R. RIBEIRO, Â. GIL, C. CARDOSO, L. B. SARDINHA, and M. BICHO. Mountain Cycling Ultramarathon Effects on Inflammatory and Hemoglobin Responses. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol. 50, No. 2, pp. 00–00, 2018. **Purpose:** This study aimed to analyze the cumulative physiological burden of repetitive, strenuous exercise held during mountain cycling ultramarathon on regulatory mechanisms of hemoglobin degradation. **Methods:** Fifty-five nonprofessional athletes (mean age, 44.8 ± 7.1 yr) participating in a 9-consecutive-day mountain cycling ultramarathon (TransPortugal) underwent anthropometric, hematological, and biochemical assessments before and immediately after the race. Participants were further stratified as completers (nine courses) or noncompleters and were divided according to the time they took to complete the race. The heme oxygenase-1 (*HMOX1*) functional genetic polymorphism and haptoglobin (*HP*) phenotypic variants were also analyzed. **Results:** Total leukocytes, neutrophil count, and monocyte count increased, whereas decreases in erythrocyte counts and hemoglobin were found between pre- and postultramarathon. Circulating haptoglobin (*HP*) was increased, whereas its soluble receptor (*sCD163*) decreased. Athletes who completed all nine courses presented with increased leukocyte, neutrophil, and erythrocyte counts, as well as hemoglobin, red cell distribution width, total bilirubin, and total cholesterol levels. High-sensitivity C-reactive protein and *HP* decreased in comparison with noncompleters. *HMOX1* and *HP* genetic polymorphisms were associated with biochemical profile, notably with *HP* levels. Analysis of covariance showed a significant effect of *HP* phenotype in *HP* circulating levels at the end of race and on the magnitude of variation from pre- to posttrace. **Conclusions:** Present findings support a comodulatory influence of genetic- and exercise-associated factors on resulting inflammatory and hemoglobin catabolic marker *HP* after highly demanding endurance exercise. **Key Words:** LONG-TERM EXHAUSTIVE EXERCISE, ACUTE-PHASE PROTEINS, HEMOGLOBIN CATABOLISM, METABOLISM

The health benefits of regular physical exercise are well documented, with evidence of association with significant improvements in survival and life quality and in inactivity-related diseases, such as obesity, dyslipidemia, hypertension, and cardiovascular disease (1). However, on another side of the same coin, extreme strenuous physical exercise has recently been linked with serious damage on organs and systems, ultimately affecting health (2). It is well established

that physiological plasticity allows humans to adapt to regular and moderate-intensity physical exercise (3), although insights into mechanisms of adaptation to extreme exercise remain conspicuous. Only a few studies, in a small number of athletes, focused on the effects of cycling/running ultramarathon on blood and inflammatory markers (4–7). Repeated, strenuous, long-duration endurance efforts in the context of a 9-d cycling ultramarathon competition have not been physiologically characterized.

Strenuous exercise is known to induce intravascular hemolysis, thereby decreasing red blood cell mass, despite exercise-associated erythropoiesis up-regulation (8). Exercise-induced hemolysis has been described on senescent red blood cells due to decreased deformability and higher susceptibility to mechanical stress (6). Haptoglobin (*HP*), an acute-phase inflammatory marker, increases in many inflammatory-associated conditions, such as in highly demanding extreme exercise, and binds to exercise-associated hemolysis-derived free hemoglobin. Upon binding of the hemoglobin–*HP* complex with *HP*-soluble receptor (*CD163*), it plays a critical role in preventing

AQ3 Address for correspondence: Isanete Alonso, Environmental Health Institute, Laboratory of Genetics, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Avenida Professor Egas Moniz, Piso 1C, 1649-028 Lisboa, Portugal; E-mail: alvesdealonso@gmail.com.

I. A., A. M., and R. R. contributed equally.
Submitted for publication April 2017.
Accepted for publication August 2017.

0195-9131/18/5002-0000/0
MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE®
Copyright © 2017 by the American College of Sports Medicine
DOI: 10.1249/MSS.0000000000001440

free hemoglobin-induced toxic effects, vascular dysfunction, and organ injury. This receptor–ligand complex works as a cellular triggering cascade upon binding and endocytosis, functioning as an immunomodulator (9). Hp is primarily synthesized in hepatocytes and leukocytes, although it is also produced by adipocytes and brain tissue in response to cytokine secretion (interleukins 6 and 1) (10). Hp is not recycled and its plasma levels recover only after 5 to 7 d, increasing with age (11). Genetic factors can account for Hp levels and may determine the severity of inflammatory response to extreme exercise. The *HP* gene has a common 1.7-kb copy number variant that influences the number of copies of a tandem two-exon segment containing a multimerization domain and determines Hp protein phenotype (12). The resulting phenotype is Hp circulating as a dimer (HP1 homozygous allele) or multimer (homozygous HP2) (13). Carrying HP1 homozygous allele has been associated with higher Hp circulating level and a more efficient antioxidant response (14). Moreover, heme oxygenase-1 (HMOX1) is responsible for degradation of heme to carbon monoxide and biliverdin and free ferrous iron (15). Iron is released by the action of HMOX1, stored as ferritin, and transported by transferrin to the bone marrow to be reused in hemoglobin synthesis (15). A functional genetic polymorphism of *HMOX1* in locus $-413T/A$ has been related to higher activity (16).

Here, we sought to analyze changes in blood cell counts and circulating inflammatory parameters, with a focus on mechanisms of red blood cells and hemoglobin catabolism in response to a 9-d cumulative strenuous effort cycling ultramarathon. Furthermore, we hypothesized that the regulatory mechanisms involved in hemoglobin degradation in response to extreme exercise might be dependent on genotypic variation in *HP* and *HMOX1*.

METHODS

Participants. Participants in a cycling ultramarathon (TransPortugal) were contacted before the race for participation in this study. Of the 76 athletes who started the race, 55 accepted and were eligible for inclusion (25–60 yr of age, willing to donate blood samples before and in the end of the race). Participants were healthy amateur athletes from 20 nationalities (mainly Caucasians, 92.7%), with a mean age of 44.8 ± 7.1 yr (range, 27–56 yr). Blood was collected through venipuncture of the forearm and processed immediately before the start of the race (prerace) and immediately after the final course (postrace), as soon as they were finishing the race, between 5 and 15 min after completing the final course. Bioelectric impedance was only performed before the start of the race, because immediately after, the hydric level is expected to vary significantly, which will influence hemodilution and analyte concentration.

TransPortugal is a 1150-km off-road cycling race across forest tracks, gravel roads, and steep single tracks on cliff tops across Portugal, from north to south in 9 d (from Bragança to Sagres). It is formally subscribed in the Portuguese Cycling Federation and is characterized by a high level of technical

requirements and by adverse conditions of routes, through everyday course (shortest 95 km and longest 162 km), with a total of 24,500-m vertical climbing. Temperature and humidity data were obtained for each course of TransPortugal from registries of the Portuguese Institute of the Sea and the Atmosphere. According with the rules of TransPortugal, disqualification occurs when participants withdraw or achieve three uncompleted courses.

This study was approved by the Scientific and Ethic Committees of the Lisbon Academic Medical Centre (Faculty of Medicine, University of Lisbon) and was conducted in agreement with the Declaration of Helsinki. All athletes gave their written informed consent.

Anthropometric measurements. Weight and height were measured according to standardized procedures previously described (17). Body mass index (BMI) was calculated using the following formula: $\text{weight (kg)}/\text{height}^2 (\text{m}^2)$.

Body composition estimates (fat mass % and fat-free mass %) were determined through bioelectrical impedance analysis (BIA) using a portable tetrapolar bioelectrical system (Quantum X; RJL Systems Inc., Clinton Township, MI).

Hemogram and biochemical determinations. Venous blood was collected into EDTA tubes, separated and kept at 4°C until further processing. Routine hematological cell count (cell counter cytometer; Beckman-Coulter) and biochemical measurements (C-reactive protein (CRP) was determined by turbidimetry, whereas total cholesterol, HDL, and LDL fractions were measured by using automated enzymatic assays; ABX Diagnostic) were analyzed at a certified clinical laboratory, Joaquim Chaves Laboratory. Serum Hp was determined by nephelometry, whereas CD163 level was measured by using precoated enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine human CD163; R&D Systems, Abingdon, United Kingdom).

Determination of genetic polymorphisms. The polymorphism in *HP* (*HP* 1.1, *HP* 2.1, and *HP* 2.2) was determined in plasma using polyacrylamide gel electrophoresis, and its presence was detected by peroxidase activity in the complex Hp–hemoglobin over the color using as substrate *o*-dianisidine, as previously reported (18).

Genomic DNA was isolated through a nonenzymatic method adapted from a previously described method (19). A single-nucleotide polymorphism in *HMOX1* gene, a substitution $A > T$ located at the position -413 in the promoter region (rs2071746), was determined by using a two-tube multiplex polymerase chain reaction (PCR). Briefly, the region of interest was amplified using an allele-specific PCR in a 25- μL reaction: 10 mM of each primer (direct A: 5'FAM-TGATGTTGCCACCAGGCTA3', direct T: 5'FAM-TGATGTTGCCACCAGGCTT3' and reverse: 5'GGAGCAGTCATATGACCCTTGGG3'), 100 ng of genomic DNA, 0.2 mM nucleotides, DreamTaq Green with 10 mM dNTP, 1.5 mM MgCl_2 , and 1 U Taq polymerase (Thermo Scientific). PCR conditions were an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 28 cycles of amplification (94°C for 30 s, 61°C for 30 s, 72°C for 40 s), and a final extension step of 72°C for 10 min. The resulting fragment was a 290-bp band, resolved by electrophoresis in a 3%

AQ4

agarose gel stained with ethidium bromide ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 60 min at 80 V. Quality control procedures for genotyping included double sampling of 10% of the samples to assess reliability and the use of negative controls to step-away false positives. Two authors obtained the results independently, and the ambiguous results were reanalyzed.

Statistical analysis. Departure from normality was tested using Shapiro–Wilk test. Descriptive statistics are presented as mean \pm SD or median (interquartile range). Comparison between central tendency values was done using independent-measures *t*-test and factorial ANOVA or Mann–Whitney and Kruskal–Wallis tests, accordingly. Correlation between continuous variables was conducted by Spearman correlation coefficients and linear regression analyses (with equation determination).

To examine the effect of time to complete the race, athletes in physiological variables were divided into tertiles (fast, ≤ 3715 min; intermediate, 3715–4030 min; and slowest, ≥ 4030 min).

Change in plasma volume (ΔPV) between before and after exercise was calculated using the Dill and Costill equation (20,21): $\Delta\text{PV} (\%) = 100 \times [(\text{HbPre}/\text{HbPost}) \times (100 - \text{HtcPost}) / (100 - \text{HtcPre}) - 1]$ (where Hb is hemoglobin; Htc, hematocrit; Pre; prerace; Post, postrace). Postrace analytes levels were corrected for hemoconcentration [Postrace corrected = Postrace uncorrected $\times (1 + \Delta\text{PV}(\%)/100)$]. The difference between measurements for each variable from before-to-after race (gain) was calculated for each participant [$\Delta\% = 100 \times (\text{Postrace}_{\text{corrected}} - \text{Prerace}/\text{Prerace})$].

One-way ANCOVA was used to determine the relation of *HP* phenotypes to Hp levels and that of *HMOX1* genotypes to bilirubin levels while controlling for relevant variables from previous analyses.

Statistical analyses were conducted using SPSS version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) and GraphPad Prism package (GraphPad Prism 6; Software Inc., La Jolla, CA). Significance was attributed if $P < 0.05$.

RESULTS

At departure, the TransPortugal race started with 76 athletes, from which 55 accepted to participate in current study. Five of these participants lack data for postrace because of incomplete ($n = 1$) and accidents ($n = 3$) during the course, and one athlete refused to participate. Mean temperature and humidity conditions during the event were $17.0^\circ\text{C} \pm 2.0^\circ\text{C}$ (14.9°C – 18.7°C) and $54.7\% \pm 6.2\%$ (50.5% – 59.5%), respectively. Mean temperature and humidity of each course are depicted in Figure 1.

[F1]

Rest and postexercise data, as well as the gain (% of variation) adjusted for plasma volume variation, are depicted in Table 1 for body composition, hematological, and inflammatory markers. Anthropometric data, for weight and height, were collected before and after the race (BMI decreased by approximately 4%), whereas waist, fat mass, and free fat mass measurements were performed only at rest before the race, representing the baseline body composition profile of participants

[T1]

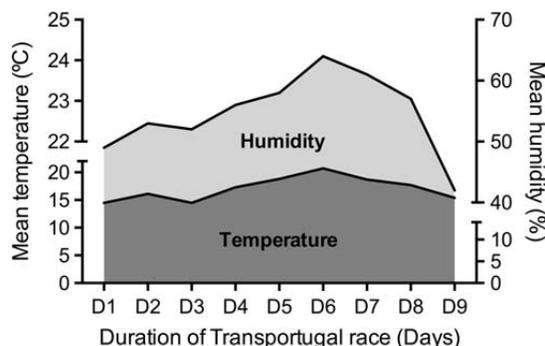


FIGURE 1—Mean temperature and humidity conditions during the TransPortugal cycling ultramarathon.

(mean body fat, $16.7\% \pm 0.5\%$; Table 1). Both in the beginning and at the end of the cycling ultramarathon, hematological cell counts were within normal clinical reference values. Nevertheless, peripheral blood cell counts demonstrated important variations in association with this extreme effort. Total leukocytes increased due to neutrophil and monocyte count (by 70% and 61%, respectively; $P = 0.0001$ and $P < 0.0001$; Table 1). Erythrocyte count and hemoglobin concentration increased significantly by 2.1% and 3.4%, respectively ($P < 0.0001$; Table 1). Inflammatory parameters were also modified in response to exhaustive exercise, CRP increased nearly 13,000% ($P < 0.0001$), whereas Hp and its soluble receptor CD163 behave differently with strenuous exercise. Hp increased by 72.2% ($P < 0.0001$) and, although without statistical significance, CD163 varied 1.2% from pre- to postrace ($P = 0.710$; Table 1). Circulating levels of hepatic transaminases were significantly increased (by 181.2% for alanine aminotransferase (ALT) and 138% for aspartate aminotransferase (AST), $P < 0.0001$). Total bilirubin and cholesterol levels were comparable between baseline and postrace measurements.

Of all the athletes who adhered to this study with concomitant predata and postdata ($n = 50$), 37 completed the nine courses of TransPortugal. Therefore, athletes were then separated into two groups (those who completed all nine courses ($n = 38$ at baseline and $n = 37$ in the end of the race) in one group and the remaining in another group ($n = 16$ at start and $n = 13$ in the end)) and compared for hematological and biochemical parameters in both moments of the race and in relation to the magnitude of effect for each parameter ($\Delta\%$; Table 2). Significant differences in erythrocyte and lymphocyte cell count were found between groups. At the end of this strenuous cycling, ultramarathon athletes who completed all nine courses had higher leukocyte and neutrophil count ($P = 0.022$), neutrophils ($P = 0.018$), erythrocyte count ($P = 0.004$), and superior concentration of hemoglobin ($P = 0.004$), cholesterol ($P = 0.001$), and total bilirubin ($P = 0.002$) compared with noncompleters. Completers of all courses of the ultramarathon presented with significantly lower levels of the inflammatory markers CRP and Hp compared with participants who have not completed all courses of the race ($P = 0.048$ and

TABLE 1. Body composition, hematological, and metabolic markers at baseline and postrace, and magnitude of effect ($\Delta\%$) during the TransPortugal cycling ultramarathon.

Parameters	9-d Cycling Ultramarathon			
	Prerace (n = 55)	Postrace _{corrected} (n = 50)	P	$\Delta\%$ (n = 50)
Weight, kg	75.6 ± 1.4	72.6 ± 1.3 ^a	<0.0001 ^b	—
BMI, kg·m ⁻²	24.1 ± 0.3	23.1 ± 0.3 ^a	<0.0001 ^b	—
Waist, cm	80.9 ± 1.0	—	—	—
Fat percent, %	16.7 ± 0.5	—	—	—
Fat-free mass, %	83.2 ± 0.5	—	—	—
Total body water, %	60.3 ± 0.7	—	—	—
Leukocyte count, n·10 ⁹ ·L ⁻¹	5.9 (4.9–5.9)	7.9 (6.2–9.7)	<0.0001 ^c	+38.1 ± 5.4
Lymphocytes, n·10 ⁹ ·L ⁻¹	1.7 (1.4–2.0)	1.6 (1.4–2.0)	0.484 ^c	+3.0 ± 5.5
Neutrophils, n·10 ⁹ ·L ⁻¹	3.7 (2.8–4.6)	5.9 (4.3–7.0)	0.0001 ^c	+70.2 ± 12.6
Monocytes, n·10 ⁹ ·L ⁻¹	0.3 (0.2–0.3)	0.4 (0.4–0.5)	<0.0001 ^c	+61.4 ± 10.6
Erythrocyte count, n·10 ¹² ·L ⁻¹	4.7 ± 0.04	4.8 ± 0.1	0.003 ^b	+2.1 ± 0.7
Hemoglobin, g·dL ⁻¹	14.3 ± 0.1	14.9 ± 0.2	<0.0001 ^b	+3.4 ± 0.7
RDW	12.8 ± 0.4	15.3 ± 0.3	<0.0001 ^b	+19.0 ± 2.1
Total bilirubin, mg·dL ⁻¹	0.3 (0.2–0.5)	0.3 (0.2–0.6)	0.237 ^c	+22.9 ± 9.4
ALT, U·L ⁻¹	22.0 (18.0–27.5)	47.0 (36.8–66.5)	<0.0001 ^c	+181.2 ± 31.6
AST, U·L ⁻¹	24.0 (20.0–28.0)	47.6 (36.7–60.3)	<0.0001 ^c	+138.5 ± 21.1
GGT, U·L ⁻¹	16.0 (12.0–22.5)	23.5 (17.2–41.3)	<0.0001 ^c	+117.9 ± 28.9
hs-CRP, mg·dL ⁻¹	0.01 (0.004–0.05)	0.9 (0.3–2.1)	<0.0001 ^c	+13,067.5 ± 2394.4
Total cholesterol, mg·dL ⁻¹	182.0 (161.5–212.0)	174.2 (149.6–220.1)	0.175 ^c	-1.5 ± 2.0
Hp, mg·dL ⁻¹	99.9 ± 5.7	155.5 ± 7.9	<0.0001 ^b	+72.2 ± 13.7
sCD163, ng·mL ⁻¹	540.7 (384.8–633.1)	534.2 (355.9–607.8)	0.710 ^c	+1.2 ± 3.3

Data are presented as mean ± SEM or median (interquartile range) in agreement with departure from normality. Postrace corrected = Postrace uncorrected × (1 + Δ Plasma volume (%)/100); $\Delta\%$, magnitude of effect [$\Delta\% = 100 \times (\text{Postrace}_{\text{corrected}} - \text{Prerace})/\text{Prerace}$].

^aPostrace values without correction for plasma volume.

^bP values for comparisons between pre- and postrace values were calculated using repeated-measures t-test.

^cP values for comparisons between pre- and postrace values were calculated using Wilcoxon test.

hs-CRP, high-sensitivity CRP.

AQ5

$P = 0.007$, respectively; Table 2). Moreover, the group including completers compared with noncompleters evidenced superior gain of leukocyte ($P = 0.013$) and neutrophil ($P = 0.004$) count, and total cholesterol ($P = 0.023$) and total bilirubin ($P = 0.010$) levels. The effect of this cycling ultramarathon on red blood cell count was more pronouncedly increased in completers compared with noncompleters, for erythrocyte count ($P = 0.015$), hemoglobin concentration ($P = 0.015$), and red cell distribution width (RDW; $P = 0.007$). Conversely, Hp increased less for completers compared with noncompleters ($P = 0.014$) (Table 2).

The average speed to complete TransPortugal varied between 120 m·min⁻¹ for the fastest and 390 m·min⁻¹ for the last athlete. Thirty-seven athletes completed all nine courses and were included into tertiles according to the time to complete the race, although no effect was found in the time to complete the ultramarathon for the analyzed variables (data not shown).

Genotype frequencies were analyzed in known functional polymorphisms at *HP* (*HP* 1.1, 0.24; *HP* 2.1, 0.42; and *HP* 2.2, 0.34) and *HMOX1* genes (A homozygous, 0.11; heterozygous, 0.55; and T, homozygous, 0.34). The analyzed polymorphisms were not associated with having completed the ultramarathon or with the time to complete the race (data not shown). Noteworthy, there were significant genotype-phenotype interactions, considering both all athletes and only the completer group (Figs. 2 and 3, respectively). We present results using recessive and dominant models, respectively, for *HMOX1* and *HP* genetic variants. The *HMOX1* AA genotype was associated with higher prerace leukocyte count for both the overall group and only in completers. Notably, in the group of athletes that completed nine courses, the *HMOX1* homozygous A carriers presented higher lymphocyte counts

and Hp levels at both pre- and postrace (Fig. 3). When all athletes were included in the analysis, the AA genotype was only associated with higher lymphocyte counts in the prerace (Fig. 2).

For *HP* polymorphism, we found that athletes carrying the 2.2 phenotype had increased gain in neutrophils and lower Hp levels in both pre- and postrace moments (Figs. 2 and 3). The gain % in hemoglobin and cholesterol levels was increased only when all athletes were analyzed.

Analysis of covariance showed significant effect of *HP* genetic variants on Hp postrace circulating levels ($F = 13.017$, $P = 0.001$), controlling for the variation in hemoglobin, age, and time of performance. For Hp gain ($\Delta\%$) as a continuous dependent variable in ANCOVA analysis, the effect of *HP* genetic variants remained significant ($F = 5.103$, $P = 0.029$).

DISCUSSION

Cumulative strenuous physical exercise, such as TransPortugal cycling ultramarathon, is representative of ultimate extreme exercise, which can expose the organism to significant stress and expand the boundaries of adaptive and plastic human physiological capacity. Here, the exercise was performed for extended periods of time, for 9 consecutive days with minimal rest, and with underlying cumulative fatigue effects. Beyond the local and systemic trauma, individuals were subjected to adverse weather conditions and terrain. Athletes participating in the TransPortugal cycling ultramarathon were nonprofessionals; therefore, although they exercise frequently, it is unlikely to reach the level of physiological and metabolic preparedness that elite athletes are supposed to have. Therefore, the TransPortugal characteristics and nonprofessional profile of participants render

TABLE 2. Comparisons between athletes who completed ($n = 37$) and those who uncompleted ($n = 13$) all nine courses of the TransPortugal cycling ultramarathon.

	Prerace				Postrace _{corrected}				$\Delta\%$	P^a
	Incomplete Courses ($n = 16$)		All Courses ($n = 38$)		Incomplete Courses ($n = 13$)		All Courses ($n = 37$)			
	Mean (range)	SEM	Mean (range)	SEM	Mean (range)	SEM	Mean (range)	SEM		
Leukocyte count, $n \cdot 10^9 \cdot L^{-1}$	5.6 (4.9–7.4)	0.19	5.9 (5.0–6.8)	0.19	6.9 ± 0.7	8.6 ± 0.3	0.022 ^b	+45.9 ± 5.9	0.013 ^a	
Lymphocytes, $n \cdot 10^9 \cdot L^{-1}$	1.5 (1.3–1.7)	0.015 ^b	1.7 (2.4–2.0)	0.015 ^b	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.1	0.683 ^a	-5.2 (-14.8 to 12.8)	0.666 ^b	
Neutrophils, $n \cdot 10^9 \cdot L^{-1}$	3.7 (2.9–5.3)	0.483 ^b	3.6 (2.8–4.4)	0.483 ^b	4.7 ± 0.6	6.3 ± 0.3	0.018 ^a	+72.8 (38.1 to 110.6)	0.004 ^b	
Monocytes, $n \cdot 10^9 \cdot L^{-1}$	0.3 (0.3–0.4)	0.03	0.3 (0.2–0.3)	0.03	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.03	0.679 ^a	+32.7 (13.3 to 73.8)	0.782 ^b	
Erythrocyte count, $n \cdot 10^{12} \cdot L^{-1}$	4.6 ± 0.1	0.013 ^a	4.8 ± 0.04	0.013 ^a	4.5 ± 0.1	5.0 ± 0.1	0.004 ^a	+3.2 ± 0.8	0.015 ^a	
Hemoglobin, g dL^{-1}	13.9 ± 0.2	0.19 ^a	14.5 ± 0.1	0.19 ^a	14.1 ± 0.3	15.2 ± 0.2	0.004 ^a	+5.3 ± 0.8	0.015 ^a	
RDW	12.8 ± 0.1	0.609 ^a	12.8 ± 0.1	0.609 ^a	14.3 (13.0–14.8)	15.6 (14.7–16.6)	0.004 ^b	+10.3 (3.2 to 14.1)	0.007 ^b	
ALT, U L^{-1}	21.0 (33.3–63.0)	0.805 ^b	22.0 (35.0–61.0)	0.805 ^b	48.0 (36.6–65.8)	46.5 (39.0–70.4)	0.715 ^b	+95.1 (53.5 to 167.2)	0.407 ^b	
AST, U L^{-1}	24.0 (20.5–34.5)	0.228 ^b	22.0 (19.0–27.0)	0.228 ^b	40.1 (36.1–51.9)	47.8 (37.7–62.3)	0.095 ^b	+102.9 (71.5 to 167.4)	0.003 ^b	
GGT, U L^{-1}	17.0 (10.5–22.0)	0.697 ^b	15.5 (12.0–22.8)	0.697 ^b	26.7 (17.6–50.3)	23.1 (17.2–30.6)	0.650 ^b	+42.9 (7.5 to 108.8)	0.221 ^b	
hs-CRP, mg dL^{-1}	0.01 (0.007–0.05)	1.006 ^b	0.01 (0.004–0.05)	1.006 ^b	1.8 (0.7–2.1)	0.7 (0.2–1.6)	0.048 ^b	+6622.7 (2244.1 to 29,990.2)	0.325 ^b	
Total bilirubin, mg dL^{-1}	0.4 (0.3–0.5)	0.569 ^b	0.3 (0.2–0.5)	0.569 ^b	0.3 (0.2–0.3)	0.4 (0.2–0.6)	0.002 ^b	+24.0 (-10.4 to 65.9)	0.010 ^b	
Total cholesterol, mg dL^{-1}	165.0 (153.5–188.0)	0.114 ^b	194.0 (161.3–220.0)	0.114 ^b	155.8 (136.8–163.5)	195.8 (159.8–224.3)	0.001 ^b	+81.8 (57.0 to 107.3)	0.023 ^b	
Hp, mg dL^{-1}	106.2 ± 10.5	0.361 ^a	95.2 ± 6.3	0.361 ^a	190.8 ± 11.7	143.1 ± 9.1	0.007 ^b	+50.7 (40.9 to 72.2)	0.014 ^b	
sCD163, mg dL^{-1}	472.0 (380.1–621.4)	0.762 ^b	540.7 (383.8–652.8)	0.762 ^b	519.8 (405.1–543.5)	552.9 (354.4–621.6)	0.682 ^b	+0.6 (-11.7 to 14.3)	0.765 ^b	

Data are presented as mean ± SEM or median (interquartile range) in agreement with departure from normality. Postrace corrected = Postrace uncorrected × (1 + Δ Plasma volume (%)/100); $\Delta\%$, magnitude of effect corrected for plasma volume ($\Delta\% = 100 \times (\text{Postrace}_{\text{corrected}} - \text{Prerace}) / \text{Prerace}$).

^a P values for comparisons between pre- and postrace values were calculated using repeated-measures t -test.

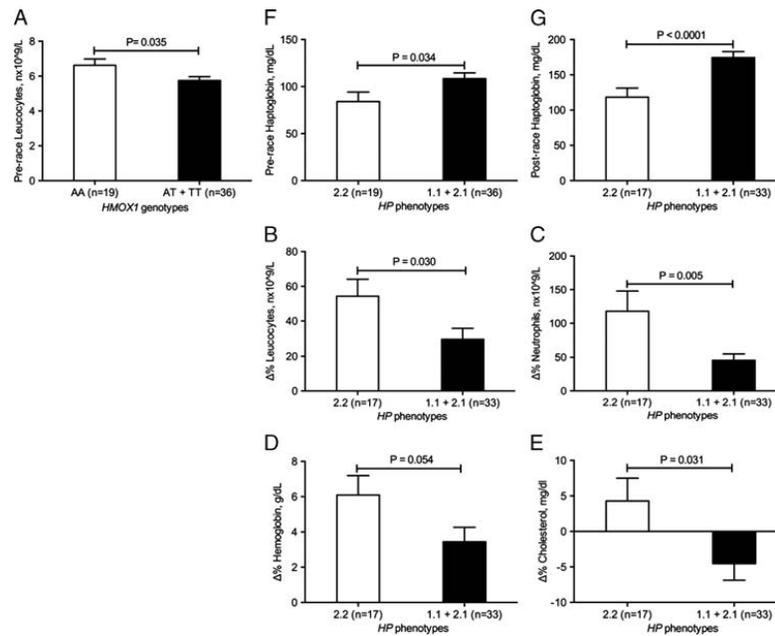
^b P values for comparisons between pre- and postrace values were calculated using Wilcoxon test.

hs-CRP, high-sensitivity CRP

our study unique, reflecting the effects of cumulative long-term repetitive exhaustive exercise in hematological and biochemical parameters of inflammation, while accounting for genetic variation. A particular interest was dedicated to the regulation of hemoglobin catabolism.

As recently observed on ultramarathon runners (7), also mountain cycling ultramarathon with a long-term strenuous profile conveys considerable effect on whole body due to frequent striking on hard surfaces, especially on the lower limbs, spine, and arms, capable of inducing hemolysis. The exercise-associated intravascular hemolysis, mainly of senescent red blood cells, seems to be related to mechanical stress in red blood cells passing through capillaries in contracting muscles and load surfaces (22). Accordingly, it was reported that one course of consecutive, strenuous exercise caused anemia (23), albeit the effect of highly demanding effort repeatedly performed for 9 consecutive days with minor rest and cumulative fatigue on anemia and hemoglobin catabolism markers is largely unknown. The exercise profile of TransPortugal has shown a significant increase in RDW, whereas decreases were observed for erythrocyte count and hemoglobin levels. We hypothesize that the repetitive and cumulative nature of the exercise demanded in this race might contribute toward increased hemolysis and catabolism of hemoglobin, allowing for neither erythropoiesis to replenish RBC nor RBC aging due to race's long duration. This decreased hemoglobin concentration and erythrocyte count, taken together with an increase of Hp in circulation after the TransPortugal race, likely reflects the adaptive buffering mechanism of Hp to sequester toxic free hemoglobin released with erythrocyte damage. Indeed, hemolysis was more pronounced in athletes exposed to increased level of stress (8). Concordantly, the effects of the cycling ultramarathon on erythrocyte count, hemoglobin, and RDW were noticeable in completers of the nine courses, who underwent higher loads of exercise, compared with noncompleters. Persistently demanding exercise seems to be also associated with extravascular hemolysis by modification of the oxidative environment in the spleen and liver due to free iron released from hemolysis (24). In fact, despite AST nonspecificity and the exercise-associated muscle damage, with subsequent releasing of the enzyme to the bloodstream, the participants in the TransPortugal race presented concomitantly with elevated ALT and gamma-glutamyltransferase (GGT) activities after the race, pinpointing toward the liver as the primary source of these enzymes (23,25), thus suggesting at least minor hepatic stress.

The soluble CD163 protein is a macrophage-specific receptor for Hp-hemoglobin complexes, known to protect from tissue damage by scavenging oxidative stress-induced by-products of hemoglobin (26,27). Only one small study ($n = 8$) on runners has revealed increased sCD163 levels after strenuous exercise such as marathon or half-marathon (28). In a 9-d cycling ultramarathon, we observed a nonsignificant sCD163 decrease from pre- to postrace, despite increased serum Hp. Hp-hemoglobin complex receptor, sCD163, is usually



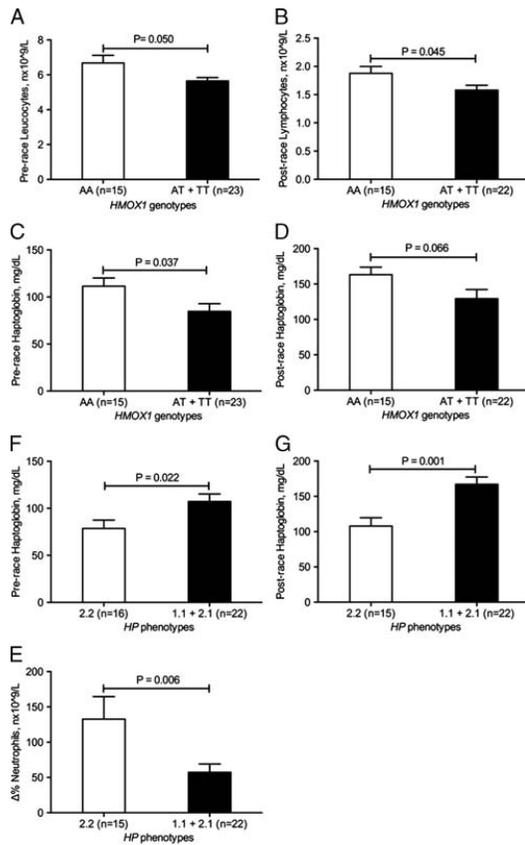
AQ6 FIGURE 2—Hematological and biochemical parameters according to *HMOX1* and *HP* polymorphisms among all athletes who performed the TransPortugal race. Comparison between central tendency values was done using Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test, except for graphs B, F, and G, with ANOVA analysis followed by Student’s *t*-tests, with values expressed as mean and SEM.

released to peripheral blood to mediate the innate immune response of appropriating hemoglobin-bound iron. The unaltered sCD163, together with higher Hp levels and decreased hemoglobin at the end of this cumulative effort, might reflect counter-regulatory and protective effects to the inflammatory, oxidative, and hemolytic effects of strenuous exercise, likely mediated by recruiting monocyte–macrophages toward the damaged skeletal muscle. In agreement, other reports make reference to an increased scavenger function of Hp–hemoglobin complex by macrophage populations in association with decreased availability of sCD163 (29), because of endocytic internalization and slow recycling. The differences in sCD163 that we observed in comparison with Niemelä et al. (28) likely reveal the cumulative effect of highly demanding physical exercise.

Conversely, heme released from shattered red blood cells is metabolized into iron, biliverdin (later to bilirubin), and carbon monoxide by HMOX1. Produced bilirubin stimulates endothelial activation of the nuclear factor–erythroid 2 p45-related factor 2 (30). This molecule, a cellular sensor of oxidative stress, further contributes to adaptation to hemolysis by up-regulating the repair and degradation of damaged macromolecules, and by modulating intermediary metabolism such as that resulting from metabolism in demanding exercises (31). Bilirubin levels, which also depend on heme metabolism by HMOX1, were not altered in all athletes after this demanding ultramarathon, suggesting that hemoglobin catabolism might

be preferentially done through the macrophage Hp–CD163 clearing pathway. However, we cannot exclude the formation of heme-hemopexin complexes that signal through CD91, ultimately up-regulating interleukin-10 expression, which is a potent inducer of HMOX1 (32), being possibly associated with the significant increased postrace levels and gain % of

bilirubin in completers. Immunoinflammation is a physiologically required process that is associated with physical exercise and contributes to repair exercise-related damaged tissues (33), when homeostasis is achievable. A long-term exhaustive and repetitive exercise implicates a cumulative load with potential effect on immunoinflammatory regulatory processes. The TransPortugal cycling ultramarathon represents such a demanding exercise type. We found that total leukocyte count in peripheral blood increased because of neutrophil and monocyte differentials, whereas the lymphocyte subset decreased significantly. These data are in agreement with established effects of strenuous exercise on leukocyte subsets after exercise (34). In addition, the group of athletes who completed all nine courses presented with higher increase of neutrophil count, which might reflect the excess load they were subjected to, in relation to non-completers. Therefore, in these exhaustive challenges, there seems to be a correlation between the intensity of performance and the circulating white line cells, suggesting the early mobilization of these cells in response to exercise. Notably, there was no derangement in leukocyte response and mobilization,



AQ8 FIGURE 3—Comparisons of hematological and biochemical parameters according to *HMOX1* and *HP* polymorphisms for athletes who completed all nine courses ($n = 37$). Comparison between central tendency values was done using Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney tests, except for graphs B, C, D, F, and G.2, with ANOVA analysis followed by Student’s *t*-tests, with values expressed as mean and SEM.

even after a 9-d repetitive strenuous effort, where a cumulative depletion was plausible. In fact, acute bouts of intensive exercise induce a proinflammatory response with transient lymphocytopenia and neutrophilia mediated through enhanced apoptosis (35), whereas regular exercise training has been shown to enhance immune function. Given that participants in TransPortugal had been training for several months before the race, despite the fact that they are non-professionals, our findings suggest that this physically demanding and cumulative exercise has minor immunological derangements for leukocytes.

Genetic studies on *HP* phenotype and *HMOX1* genotypes using analysis of covariance demonstrated that *HP* influences Hp variation during highly demanding physical exercise, although no effect was observed for *HMOX1*. These findings suggest that besides physical exertion, a genetic-dependent

modulatory effect influences Hp levels, thereby concurring for the resulting levels of the exercise-associated inflammatory marker Hp. The activation of neutrophils during exercise generates reactive oxygen species as well as the recruitment of monocytes and macrophages (36). The *HP* 2.2 phenotype was associated with elevated neutrophil levels reflecting a lower capacity to mitigate the potential local and systemic damage by reactive oxygen species production. Concordant with other studies, we noted that known hematological biomarkers such as neutrophils and high-sensitivity CRP increased at the immediate postrace time point after the ultramarathon (37). The genotype–phenotype association studies corroborate the role of *HP* genetic polymorphism inducing a more efficient antioxidant response and consequently a better performance. The functional genetic polymorphism in *HMOX1* at locus $-413T > A$ has been associated with cardioprotection during submaximal exercise (38). The effect of this variant on enzyme activity and immune function in TransPortugal race participants was determined using genotype–phenotype analyses. According to these analyses, we found that *HMOX1* AT genotype might be associated with an attempted protection from persistent damage in the bone marrow (15). Indeed, the role of *HMOX1* affects the response of white line cells throughout the process where iron was released, stored as ferritin, and transported by transferrin to the bone marrow to be reused in hemoglobin synthesis.

AQ7

In this study, we have not controlled for water and sodium ingestion, which is known to influence postexercise plasma volume, therefore accounting for a potential limitation. Nevertheless, adjustments undertaken on postrace concentrations were only minimally modified, suggesting that there was no significant variation from pre- to postrace plasma volume, confirming a good hydration of athletes throughout the ultramarathon.

Findings from current research add to our understanding on how humans handle toxicities from produced metabolites during highly demanding cumulative physical exercise. Results presented here pinpoint a complex regulatory model for controlling exercise-induced damage. Although we present findings from a unique human exercise model in a larger sample of cycling ultramarathon participants, other inflammatory markers will certainly add mechanistic insight for regulation of complexity associated with endurance exercises. These results should be taken into account when analyzing the cumulative effects of extreme physical exercise. Further studies focusing on exercise-associated hemoglobin catabolism pathways in response to other types of exercise are warranted.

The authors acknowledge the financial support from the Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral, Liberty Seguros, and Clinical Chemistry Laboratory of Grupo Dr. Joaquim Chaves.

AQ9

The authors declare no conflicts of interest and funding sources. The study is presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation. The results of the present study do not constitute endorsement by the American College of Sports Medicine.

REFERENCES

- Ebell MH, Grad R. Top 20 research studies of 2012 for primary care physicians. *Am Fam Physician*. 2013;88(6):380–6.
- Kim JH, Baggish AL. Strenuous exercise and cardiovascular disease outcomes. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(1):1.
- Impellizzeri FM, Marcora SM. The physiology of mountain biking. *Sports Med*. 2007;37(1):59–71.
- Lippi G, Salvagno GL, Danese E, Tarperi C, Guidi GC, Schena F. Variation of red blood cell distribution width and mean platelet volume after moderate endurance exercise. *Adv Hematol*. 2014;2014:192173.
- Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exerc Immunol Rev*. 2012;18:42–97.
- Robach P, Boisson RC, Vincent L, et al. Hemolysis induced by an extreme mountain ultra-marathon is not associated with a decrease in total red blood cell volume. *Scand J Med Sci Sports*. 2014;24(1):18–27.
- Chiu YH, Lai JI, Wang SH, et al. Early changes of the anemia phenomenon in male 100-km ultramarathoners. *J Chin Med Assoc*. 2015;78(2):108–13.
- Mairbörl H. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Front Physiol*. 2013;4:332.
- Landis RC, Philippidis P, Domin J, Boyle JJ, Haskard DO. Haptoglobin genotype-dependent anti-inflammatory signaling in CD163(+) macrophages. *Int J Inflamm*. 2013;2013:980327.
- Chen C-Y, Hsieh W-L, Lin P-J, Chen Y-L, Mao S-J. Haptoglobin is an exercise-responsive acute-phase protein. In: Veas F, editor. *Acute Phase Proteins—Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*. 1st ed. Rijeka: InTech; 2011.
- Alayash AI. Haptoglobin: old protein with new functions. *Clin Chim Acta*. 2011;412(7–8):493–8.
- Boettger LM, Salem RM, Handsaker RE, et al. Recurring exon deletions in the HP (haptoglobin) gene contribute to lower blood cholesterol levels. *Nat Genet*. 2016;48(4):359–66.
- Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem*. 1996;42(10):1589–600.
- Goldenstein H, Levy NS, Levy AP. Haptoglobin genotype and its role in determining heme-iron mediated vascular disease. *Pharmacol Res*. 2012;66(1):1–6.
- Taha H, Skrzypek K, Guevara I, et al. Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells: lesson from the promoter allelic variants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(8):1634–41.
- Ono K, Goto Y, Takagi S, et al. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):315–9.
- Lohmann TG, Roche AF, Martorell R. *Anthropometric Standardization Reference Manual*. 1th ed. Champaign (IL): Human Kinetics Books; 1988.
- Matos A, Pereira da Silva A, Clara Bicho M, et al. In women with previous pregnancy hypertension, levels of cardiovascular risk biomarkers may be modulated by haptoglobin polymorphism. *Obstet Gynecol Int*. 2014;2014:361727.
- Lahiri DK, Numberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
- Alis R, Sanchis-Gomar F, Primo-Carrac C, et al. Hemoconcentration induced by exercise: revisiting the Dill and Costill equation. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25(6):e630–7.
- Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol*. 1974;37(2):247–8.
- Arakawa K, Hosono A, Shibata K, et al. Changes in blood biochemical markers before, during, and after a 2-day ultramarathon. *Open Access J Sports Med*. 2016;7:43–50.
- Shin KA, Park KD, Ahn J, Park Y, Kim YJ. Comparison of changes in biochemical markers for skeletal muscles, hepatic metabolism, and renal function after three types of long-distance running: observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(20):e3657.
- Kobayashi Y, Nakatsuji A, Aoi W, Wada S, Kuwahara M, Kido Y. Intense exercise increases protein oxidation in spleen and liver of mice. *Nutr Metab Insights*. 2014;7:1–6.
- De Paz JA, Villa JG, Lopez P, Gonzalez-Gallego J. Effects of long-distance running on serum bilirubin. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(12):1590–4.
- Buehler PW, Abraham B, Vallelian F, et al. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. *Blood*. 2009;113(11):2578–86.
- Moller HJ. Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012;72(1):1–13.
- Niemelä M, Kangastupa P, Niemelä O, Bloigu R, Juvonen T. Acute changes in inflammatory biomarker levels in recreational runners participating in a marathon or half-marathon. *Sports Med Open*. 2016;2(1):21.
- Bode JG, Albrecht U, Häussinger D, Heinrich PC, Schaper F. Hepatic acute phase proteins—regulation by IL-6— and IL-1—type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB—dependent signaling. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(6–7):496–505.
- Qaisiya M, Coda Zabetta CD, Bellarosa C, Tiribelli C. Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. *Cell Signal*. 2014;26(3):512–20.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(4):199–218.
- Hull TD, Agarwal A, George JF. The mononuclear phagocyte system in homeostasis and disease: a role for heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(11):1770–88.
- Comassi M, Vitolo E, Pratali L, et al. Acute effects of different degrees of ultra-endurance exercise on systemic inflammatory responses. *Intern Med J*. 2015;45(1):74–9.
- Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*. 2000;80(3):1055–81.
- Kruger K, Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis. *Exerc Immunol Rev*. 2014;20:117–34.
- Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(8):735–42.
- Kasapis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1563–9.
- He Z, Hu Y, Feng L, et al. Association between HMOX-1 genotype and cardiac function during exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008;33(3):450–60.

Original manuscript

**Muscle-bone endocrine axis modulating adaptation to exercise in athletes of mountain cycling in a
Portuguese Marathon**

Isanete Alonso^{1,2 *}, Andreia Matos^{1,3,4 *}, Ricardo Ribeiro^{1,4,5 *}, Ângela Gil^{1,3}, Carlos Cardoso⁶, Luís Bettencourt Sardinha⁷, Manuel Bicho^{1,3}

¹ Genetics Laboratory and Environmental Health Institute, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

² Department of Nutritional Science, Atlântica University, Barcarena, Portugal

³ Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral, Lisbon, Portugal

⁴ i3S, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde and INEB, Biomedical Engineering Institute, University of Porto, Porto, Portugal

⁵ Department of Clinical Pathology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

⁶ Clinical Chemistry Laboratory, Grupo Dr. Joaquim Chaves, Lisbon, Portugal

⁷ Exercise and Health Laboratory, CIPER, Faculty of Human Kinetics, University of Lisboa, Lisbon, Portugal

*Equal contribution

Submetido no

British Journal of Sports Medicine (BJSM)

April 2018

ABSTRACT

Aim: We hypothesize that osteocalcin levels predict higher performance in long-term repetitive exhaustive exercise. We hypothesized that osteocalcin levels could be a predictor of better or higher performance in extreme long-term exercise. To test our hypothesis we measure the serum osteocalcin levels in before and after TransPortugal ultra-marathon cycling race. We then compared the athletes that completed all 9 courses versus those that completed between 3 and 6 courses.

Methods: 55 participants (mean age 44.8 ± 7.1 years old) of mountain cycling race (TransPortugal) were evaluated at the beginning/basal (M0) and 9-days post-race (M9). Anthropometric/body composition parameters, hematological and liver function were evaluated by conventional methods. Serum Irisin and plasma osteocalcin and IL-6 measurements were evaluated with ELISA (R&D systems and Phoenix Pharmaceuticals-Irisin). Statistical analyses included departure from normality and adequate parametric or non-parametric test to compare the means and the medians. The results were significant for $P < 0.05$.

Results: In the metabolic point of view, we found that this strenuous exercise induced a significant decreased of fasting insulin, triglycerides, total-cholesterol, non-HDL cholesterol, LDL and an increased of glucose, creatinin, uric acid, HDL, HOMA-B ($P < 0.05$). These results reflected the important modifications in muscle, being the myokine/adipokine, irisin, significantly decreased post-race ($P = 0.002$). In terms of bone remodeling, although not statistically significant, osteocalcin was decreased post-race ($P = 0.154$), yet the plasma IL-6, a cytokine involved in osteoclastic proliferation, was significantly increased post-race ($P < 0.0001$).

Conclusions: This study uncovers a bone-to- muscle feed forward endocrine axis that favors adaptation to exercise. Our preliminary results, revealed a possible regulation of osteocalcin in glucose and insulin

metabolism, being the slowdown in bone formation observed, a prompt metabolic response of bone to the increased energy demands of the muscle.

INTRODUCTION

Physical exercise superimposes usage of most refined human's molecular and physiological homeostatic mechanisms to adapt, particularly in the context of extreme efforts. Frequently, these highly demanding exercises are associated with the production of myokines by contracting skeletal muscles, altered immunoinflammatory response, metabolic and structural effects. Long-term, repetitive and strenuous physical exercise, challenging the boundaries of human capacity to physiologically adapt, have been only poorly studied (**REF**), particularly the involvement of integrated mechanistic axis in distinct but interacting organs, representing an ultimate model of analysing human performance limits.

During physical activity, the contracting skeletal muscle secretes many biomolecules, collectively called myokines, which induce a set of regulated endocrine effects. In metabolism, by increasing insulin sensitivity in response to the humoral response to glucose requirements^{1,2}, during both acute and long-term exhaustive exercise.

The quality of exercise (type, intensity and duration), but more importantly, the magnitude of load explain local and endocrine effects of exercise ³ (**Angela Monteleone et al., 2000-Effects of different sports on bone density). While some mentioned that repetitive stress during long training

periods may not be sufficient to increase bone mineral density (BMD) ^{5,6,7}, others suggested load intensity is more important than duration ⁴, thus modulating bone metabolism.

Bone density is influenced by bone stress or impact. Stress applied to skeletal segment affects the geometry of bone, the microarchitecture, and matrix composition ⁴. In agreement, it was shown that cyclists have lower bone mass density than runners, due to the large and repetitive load in the lower limbs that running confers, likely stimulating bone anabolism ⁸.

The skeletal muscle, as a metabolically active organ, releases several myokines; undoubtedly the most well studied is the cytokine interleukin (IL)-6, with the circulating levels increased over 100-fold with intense and prolonged exercise ^{9,10}. Moreover, during this exercise, the muscle contraction also induces augment of glucose, insulin sensitivity and other metabolic demanding's ^{11,12}.

Osteocalcin, more than a bone matrix protein ¹³⁻¹⁵, has been linked to regulation of glucose metabolism and other aspects of energy metabolism, for instance that which is observed in highly demanding physical activities such as, endurance or long-term exercises¹⁵. Mera & collaborators, depicted a feed forward mechanism by which exercise-induced secretion of osteocalcin, which increases high oxidative skeletal muscle fuel uptake and utilization during exercise, mediating the release of skeletal-muscle-derived IL-6, which in turn, positively feeds back to act on bone to amplify osteocalcin secretion during exercise ¹⁵⁻¹⁷.

Part of the osteocalcin produced by bone, remains in the bone matrix due to the affinity it has with hydroxyapatite (Gla-OC) and part is acidified (Glu-OC – metabolically active form), which has systemic effects influencing different organs throughout modulation of energy metabolism. At bone remodelling, energy is an imperative need so metabolic processes can be performed. Exercise has been pointed out as a high metabolic process, where some authors found a decrease in the Glu-OC and in the Glu-OC-to-Gla-OC ratio after the race ¹⁸.

Furthermore, the metabolic process associated to the role of osteocalcin in insulin secretion and glucose regulation, is counterbalanced by sympathetic nervous system signalling in osteoblasts that under the control of leptin favours carboxylation and therefore inactivation of osteocalcin¹⁹. The process of enhanced insulin production through the osteoblasts is counterbalanced at least in part by a leptin-dependent central control of osteocalcin carboxylation (Glu-OC). Leptin secreted by adipocytes crosses the blood-brain barrier and inhibits bone mineral accrual by suppressing brain serotonin synthesis and thereby increasing the activity of the sympathetic nervous system (SNS). In turn, the SNS acts through β 2-adrenergic receptor (ADR β 2) expressed in osteoblasts to increase ESP expression, thus decreasing insulin signalling in osteoblasts, osteocalcin bioactivity, and therefore insulin secretion¹⁹.

Although the physical activity may positively influence the biomechanical process and bone remodelling, the responsibility by such effect is not clear, and many other factors can mediate these effects, like nutrition, hormonal homeostasis and genetics⁴. Studies exploring the *ADR β 2* have highlighted the importance of this gene in endurance performance because of its expression throughout the cardiovascular, respiratory, metabolic and musculoskeletal systems, along with its influence on lipid metabolism to regulate energy expenditure from adipose tissue²⁰.

Taking into consideration those findings, we hypothesize that bone recovery is not the main focus on long-term strenuous exercise, nevertheless the counterbalance of metabolic profile may be modulated by biomarkers involved either skeletal muscle mass as bone metabolism. To test this hypothesize we measure metabolic biomarkers before and after TransPortugal ultra-marathon cycling race.

METHODS:

Study design and participants

TransPortugal is a 1150 km off-road cycling race across forest tracks, gravel roads and steep single tracks on cliff tops across Portugal, from north to south during 9 days. It is characterized by a high level of technical requirements, a not-weight-bearing riding performance and adverse conditions of routes, through every-day courses (shortest 95 km and longest 162 km), with a total of 24500 m vertical climbing.

Temperature and humidity data was obtained for each course of TransPortugal, from registries of the Portuguese Institute of the Sea and the Atmosphere (IPAM). According with the rules of TransPortugal, disqualification occurs when participant's withdraw or achieve three uncompleted courses.

Participants in this cycling ultra-marathon were contacted before the race asking to participate in this study. Of the 76 athletes who started the race, 55 accepted and were eligible for inclusion (25-to-60 years of age, willing to donate blood samples before and at the end of the race). They were healthy amateur athletes from twenty nationalities (92.7% with Caucasian ethnic background), with mean age of 44.8 ± 7.1 years (range 27-56 years). Blood was collected through venipuncture of the forearm and processed immediately before the start of the race (Pre-race) and immediately after the final course (Post-race).

This study was approved by the Scientific and Ethic Committees of the Lisbon Academic Medical Centre (Faculty of Medicine, University of Lisbon) and was conducted in agreement with the Helsinki Declaration. All athletes gave their written informed consent.

Anthropometric and body composition measurements

Weight and height were measured according to standardized procedures previously described

²¹. Body Mass Index (BMI) was calculated using the formula [weight (kg) / height (m²)].

Bioelectric impedance (BIA) was performed before the start of the race, since immediately after the race, the hydric level is expected to vary significantly, which will influence measurements with this instrument (**RJI Systems 2015; Clinical nutrition 2004_Kyle et al.,). Body composition estimates (fat mass % and fat-free mass %) were determined through BIA analysis, using a portable tetrapolar bioelectrical system (Quantum X, RJI Systems Inc., Michigan, USA). The bone mineral content obtained from BIA have a high correlation with dual energy X-ray absorptiometry (DXA) (**RJI Systems 2015; F. Matur et al., 2018-Prediction of Bone Mineral density in Menopausal Women...).

Nutritional evaluation

Energy intake was estimated from a food frequency questionnaire (FFQ) (C. 2000, Lopes Aro et al., 2007). Data were later analysed with *Food Processor Plus*® software (ESHA Research, Salem, USA). The ingestion values obtained for vitamin D, vitamin K, carbohydrates and calcium were compared with the values of the recommended daily doses published by *Institute of Medicine* (Medicine 2003).

Analytes Measurement

Evacuated tubes (Vacutainer Systems, Sarstedt Inc., Portugal) were used for analytes measurement (S-Monovette® K₃EDTA 4,9 mL plain tubes, S-Monovette® 9 mL). Immediately after drawing, tubes were inverted ten times and stored in a sealed box at 4°C. Venous blood was immediately processed after collection, before race and immediately after race. Samples were centrifuged and plasma and serum (after clot formation) recovered and stored at -80°C.

The routine biochemical parameters were analysed at a certified clinical laboratory - Joaquim Chaves Laboratory. The serum creatinine and uric acid were determined by standardized methods of the International Federation of Clinical Chemistry modified (ADVIA 1200); glucose by hexokinase

method (ADVIA 1200); creatinine by Jaffe modified method (ABVIA 1200); insulin by chemiluminiscence (ADVIA Centaur) and testosterone by HPLC.

The total osteocalcin (Gla-OC) and undercarboxylated Osteocalcin (Glu-OC) were measured, in plasma, by Sandwich Enzyme Immunoassays (Quantikine Human Gla-OC, R&D Systems, Abingdon, UK; Quantikine Human Glu-OC, EIA, Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan), using specific monoclonal antibodies directed against the different forms of OC, following the manufacturer specifications. The specificity was 0.5 ng/mL for the Gla-OC assay kit and 0.25 ng/mL for the Glu-OC assay kit, while the within-run and between-run coefficients of variation (CV) were 4.8% and 2.4% for Gla-OC and 6.7% and 9.9% for Glu-OC.

The percentage ratio of Glu-OC relative to the total OC was calculated as:

$$\text{Glu-OC (\%)} = (\text{Glu-OC}/\text{TotalOC}) \times 100$$

During the study the analyzers were regularly calibrated and controlled by both internal and external quality control schemes; moreover, all analytes were assayed by the same technician to limit analytical variability.

Determination of genetic polymorphisms

Peripheral blood samples were collected in S-Monovette® K₃EDTA 4,9 mL and stored at -20°C until DNA extraction. Genomic DNA was isolated according to a previously described method ²². Quantity and integrity of DNA were assessed using Nanodrop and gel electrophoresis.

The osteocalcin gene (*BGLAP*, rs1800247) genotypes were performed using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The presence of the rs1800247 polymorphism was detected by amplifying genomic DNA with the following oligonucleotide primers:

forward, 5'-CCGCAGCTCCCAACCACAATAAGCT-3'; and reverse, 5'-CAA-TAGGGCGAGGAGT-3'. The PCR reaction was performed in a total volume of 25 µl, consisting of 2 µl of genomic DNA, 1 µl of each primer, 12.5 µl of DreamTaq Green (Thermo Scientific), and 8.5 µl of nuclease-free double-distilled water. For rs1800247 genotype, the amplification protocol comprised initial denaturation at 95°C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 58°C for 30 sec, and extension at 72°C for 60 sec; and a final extension at 72° for 7 min. Afterwards and for rs1800247, 10 µl aliquots of the PCR products were digested at 37°C for 3 hours with 1 µl of HindIII restriction enzyme. Digested fragments were separated by electrophoresis in 2% agarose gel containing ethidium bromide and the fragments visualized by the UV transilluminator. As a result, for rs1800247 polymorphism, the homozygous CC genotype yielded 253bp products, heterozygous CT genotype yielded 253bp and 232bp product, whereas homozygous TT allele yielded a 232bp product.

Genotyping of leptin gene (*LEP*, rs1137101) was performed by PCR amplification using *LEP* polymorphism-specific primers: 5'-TTTCCTGTAATTTCCCGTGAG (forward), 5'-AAAGCAAAGACAGGCATAAA (reverse). The PCR reaction was performed in a total volume of 25 µl, consisting of 100ng of genomic DNA, 1 µl of each primer, 12.5 µl of DreamTaq Green (Thermo Scientific), and 0.5 µl of nuclease-free double-distilled water. The amplification protocol comprised initial denaturation at 95°C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min; and a final extension at 72° for 5 min. The PCR product was electrophoresed in 2% agarose, stained in 0.5% ethidium bromide and photographed under UV illumination. The resulting 242 bp DNA fragment was incubated at 37 °C for 24 h with Hin6I, an isosquizomer of CfoI. The polymorphism was defined by the presence (G) or absence (A) of a restriction site.

The beta-2 adrenergic receptor (*ADRβ2*, rs1042713) was performed by PCR amplification using polymorphism-specific primers: 5'-CCTTCTTGCTGGCACCCCAT (forward), 5'-

GGAAGTCCAAAACCTTCGCACCA (reverse). The PCR reaction was performed in a total volume of 25 µl, consisting of 100ng of genomic DNA, 1 µl of each primer, 12.5 µl of DreamTaq Green (Thermo Scientific), and 0.5 µl of nuclease-free double-distilled water. The amplification protocol comprised initial denaturation at 95°C for 5 min; 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 63.6°C for 30 sec, and extension at 72°C for 145 sec. The PCR product was electrophoresed in 2% agarose, stained in 0.5% ethidium bromide and photographed under UV illumination. The resulting 308 bp DNA fragment was incubated at 37 °C for 5 min, 65°C for 15 min with NcoI. The homozygous AA genotype yielded 308 bp product, heterozygous AG genotype yielded 308 bp, 291 bp and 17 bp products, whereas homozygous GG allele yielded a 291 bp and 17 bp products.

For genotyping of osteocalcin receptor (*GPRC6A*, rs2274911) it was performed the endpoint analysis (allelic discrimination assays) in MyGo Pro (**). The determination was performed in a total volume of 25 µl: 11.25 µl of genomic DNA with concentration of 5ng/µl, 12.5 µl of diluted 20x master mix and 1.25 µl of assay from Applied Biosystems (TaqMan® SNP Genotyping and Master Mix). The results were analysed in MyGo Pro program (**). VIC FAM

Genotyping reproducibility testing included random re-sampling of 10% of the samples, whereas negative controls were included in every run to step-away false-positives. Two authors analysed the results independently, and the divergent were re-analysed.

Statistical analysis

Departure from normality was tested with Shapiro-Wilk test. Descriptive statistics are presented as mean±standard deviation (M±SD) or median (interquartile range) [Med(IQR)]. Comparison between central tendency values was done through independent-measures t-test and factorial ANOVA for parametric variables or Mann–Whitney U and Kruskal–Wallis tests for non-

normally distributed. The degree of association between continuous variables was conducted by linear regression analyses and calculating Spearman's correlation coefficients.

In order to examine the association of time to complete the race in physiological variables, we converted it into tertiles and analysed as categorical (fast, ≤ 3715 min; intermediate, 3715-4030 min; and slowest, ≥ 4030).

Change in plasma volume (ΔPV) between before and after exercise was calculated using the Dill and Costill equation^{23,24}: $\Delta PV(\%) = 100 \times [(HbPre/HbPost) \times (100-HtcPost) / (100-HtcPre)-1]$, (Hb, hemoglobin, Htc, hematocrit, Pre, pre race, Post, post race). Post-race analytes levels were corrected for hemoconcentration [Post-race corrected = Post-race uncorrected $\times (1+\Delta PV(\%) / 100)$]. The difference between measurements for each variable from before-to-after race (gain) was computed for each participant by subtracting athlete's pre-race from post-race corrected for hemoconcentration value [$\Delta\% = 100 \times (Post\ race\ corrected - Pre\ race / Pre\ race)$].

The homeostatic model assessment (HOMA) method was used to quantify fasting insulin resistance and β -cell function (Matthews et al., 1985). The nonlinear model of two types of HOMA scores were used: $HOMA\ IR = (fasting\ insulin\ in\ mU.l^{-1}) \times fasting\ plasma\ glucose\ in\ mmol.l^{-1} / 22.5$; $HOMA\ \beta\ [\%] = 20 \times (fasting\ insulin\ in\ mU.l^{-1}) / ((fasting\ glucose\ in\ mmol.l^{-1}) - 3.5)$.

Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated as a measure of association between *BGLAP*, *LEP*, *ADR β 2* and *GPRC6A* genotypes and prediction of better performance. Unconditional logistic regression analysis was used to compute ORs and CIs estimating the association of genotypes to better performance adjusted for age, gender, pre-race of fat mass percentage, pre-race of waist or average speed.

The one-way ANCOVA was conducted to determine the relation of phenotypes and *BGLAP*, *LEP*, *ADR β 2* and *GPRC6A* genotypes with *** circulating levels while controlling for relevant variables from previous analyses.

Statistical analyses were conducted using SPSS version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism package (GraphPad Prism 6, Software Inc. La Jolla, USA). Significance was attributed when $P < 0.05$.

Results

Table 1 depict descriptive data of variables analysed in this study. For each variable, the baseline, the post-race corrected for plasma volume and the magnitude of effect are shown. Interleukin (IL)- 6 increased by more than 1100 percent ($P < 0.0001$) from baseline to the end of race (Table 1). Other muscle markers increased significantly by 25.7% for creatinine and by 267.9% for uric acid (both $P < 0.0001$) (Table 1). At the level of liver function, although with the normal range, glucose increased significantly near forty percent ($P < 0.0001$), whereas HOMA- β significantly decreased about 5% ($P = 0.005$).

The effects of these long-term strenuous exercise was also reflected in association between the nutritional, body composition, bone and metabolic markers (Table 3). Firstly, according with the baseline nutritional status, we evaluate nutrients that may be associated with performance or the muscle-bone interaction that we aimed to discuss (Tables 1 and 3). According with dietary reference intakes (DRI), vitamin D and vitamin K were lower of the desirable recommendations; nevertheless, carbohydrates and calcium were within the recommended values (Table 1). Despite that, the intake of vitamin K was directly correlated with post-race glucose ($r = 0.346$, $P = 0.027$), $\Delta\%$ insulin ($r = 0.328$, $P = 0.026$), $\Delta\%$ HOMA-IR ($r = 0.315$, $P = 0.033$) and $\Delta\%$ HOMA- β ($r = 0.322$, $P = 0.029$) (Table 3). On the other hand, the ingestion of carbohydrates has an opposite influence with the previously metabolic markers, being inversely correlated with post-race of glucose ($r = -0.349$, $P = 0.017$), $\Delta\%$ ($r = -0.307$, $P = 0.038$), insulin

($r=-0.380$, $P=0.009$), HOMA-IR ($r=-0.409$, $P=0.005$) and HOMA- β ($r=-0.317$, $P=0.032$) (Table 3). And the calcium ingestion was inversely correlated with $\Delta\%$ glucose ($r=-0.290$, $P=0.044$) (Table 3).

Significant differences in relation to the correlations between the body composition, bone and metabolic markers were also found. The anthropometric and body composition status of athletes before the race were significantly associated to post-race of uric acid, Gla-OC and testosterone. Specifically, the post-race values of uric acid were directly associated to weight ($r=0.344$, $P=0.018$), waist ($r=0.357$, $P=0.012$), skeletal muscle mass ($r=0.393$, $P=0.005$) and bone mineral content ($r=0.346$, $P=0.014$) (Table 3). For post-race Gla-OC levels, the direct correlations were obtained for BMI ($r=0.353$, $P=0.012$) and skeletal muscle mass ($r=0.311$, $P=0.028$). The other bone marker, the post-race of testosterone, was directly associated to BMI ($r=0.375$, $P=0.007$), waist ($r=0.422$, $P=0.003$) and $\Delta\%$ testosterone with fat mass percent ($r=0.304$, $P=0.032$), although with an inverse correlation with fat-free mass ($r=-0.304$, $P=0.032$). The post-race bone markers were correlated between them (Gla-OC vs testosterone: $r=0.290$, $P=0.041$). On the one hand, post-race Gla-OC levels were directly associated to post-race glucose ($r=0.280$, $P=0.045$), creatinine ($r=0.538$, $P<0.0001$) and uric acid ($r=0.338$, $P=0.016$); and on the other, post-race testosterone levels were directly associated to creatinine and uric acid ($r=0.344$, $P=0.014$; $r=0.303$, $P=0.032$, respectively).

After this strenuous exercise, the myokine IL-6 was inversely correlated with BMI ($r=-0.281$, $P=0.048$) and directly correlated with the variation of following metabolic markers: uric acid ($r=0.341$, $P=0.015$), insulin ($r=0.287$, $P=0.042$), HOMA-IR ($r=0.289$, $P=0.042$) and HOMA- β ($r=0.315$, $P=0.026$) (Table 3).

Out of all the athletes who adhered to this study with concomitant pre- and post-data ($n=50$), 37 completed the 9 courses of TransPortugal. Therefore, athletes were then separated in two groups [those who completed all 9 courses ($n=38$ at baseline and $n=37$ in the end of the race) in one group,

and the remaining in another group (n=16 at start and n=13 in the end)) and compared for muscle, liver and bone markers in both moments of the race and in relation to the magnitude of effect for each parameter ($\Delta\%$) (Table 2). Interestingly completers presented increased levels of post-race creatinine (P=0.001), uric acid (P=0.050), glucose (P=0.002), insulin (P=0.048) and HOMA-IR (P=0.013) (Table 2). The completers maintained this pattern for the metabolic parameters mentioned above and even more a significant variation with increase of myokine IL-6 by more than 500% of increase (P=0.043).

In order to examine the impact of average speed to complete the TransPortugal race cycling ultramarathon, athletes were categorized in three groups determined by tertiles of average speed (fast, ≤ 0.29 Km/min.; intermediate, 0.29-0.31 Km/min.; slow, ≥ 0.31 Km/min) (Figure 1). The slowest athletes presented lower levels of post-race IL-6 and a negative variation of HOMA- β comparing with the others average speed groups, specially, between the intermediate group (P=0.019 and P=0.020, respectively) (Figure 1 a and b).

Furthermore, thirty-seven athletes ended all 9 courses and were included into tertiles according to the time to complete the race (fast: ≤ 3715 min, intermediate: 3715-4030 min and slowest: ≥ 4030). For this stratified analysis, significant differences in glucose, HOMA- β and Gla-OC were found between groups (Figure 2). The plasma glucose both after race and variation, were significantly higher in slowest athletes comparing with the other groups (P<0.05) (Figure 2 a and b). Contrary, the levels of post-race and magnitude of effect for HOMA- β were significantly lower in slowest athletes (P<0.005) (Figure 2 c and d). For bone markers, the variation of Gla-OC levels was significantly lower in fast athletes (Figure 2 e).

Genotype frequencies were analyzed in known polymorphisms at *LEP* genes (G homozygous 0.29; heterozygous 0.51 and A homozygous 0.20), *ADR β 2* (G homozygous 0.51; heterozygous 0.42 and A homozygous 0.07) and *BGLAP* (T homozygous 0.60; heterozygous 0.31 and C homozygous 0.09). The athlete's carriers A of *LEP* polymorphism were more preponderant to finish all courses of the

ultramarathon adjusting for age, gender, average speed and baseline of fat mass percentage and waist (OR=5.0 [1.1-22.5], P=0.036) (Table 4). Interestingly, this model loses statistical significance when also adjusted for percentage of variation of glucose, being the latter a possible modulator for athletes to complete all courses of TransPortugal race ($\Delta\%$ glucose: OR=1.0 [1.0–1.0], P=0.040) (data not shown). Furthermore, we found that the athlete's carriers A of *LEP* polymorphism presented a favorable predisposition to finish the race faster, adjusted for age, fat mass percentage in pre-race, waist in pre-race and with all courses (OR=8.0 [1.1–61.1], P=0.044) (Table 4). The *BGLAP* and *ADR β 2* polymorphisms were not associated with having completed the ultramarathon or nor with time to complete the race (data not shown).

There were also significant genotype-phenotype interactions both considering all athletes and only the completers group (Figures 1 and 2). We present results using recessive models for *BGLAP* and *LEP* genetic variants and dominant model for *ADR β 2* genetic variant. The A carriers of *LEP* polymorphism were associated with higher percentage of variation of uric acid and Gla-OC (Figure 1). In the group of athletes that completed all 9 courses the *LEP* homozygous A carriers presented post-race and increased gain in IL-6 (Figure 2), although in all athletes, this interaction was just a trend (Figure 1). For *ADR β 2* polymorphism, the carriers of G genotype had lower levels in post-race of insulin, HOMA-IR and HOMA- β (Figures 1 and 2). For *BGLAP* polymorphism, the carriers of C genotype had higher levels of post-race and percentage of variation of HOMA-IR and HOMA- β (Figures 1 and 2), except for post-race values of HOMA- β in only for all athletes analyses (Figure 1). For Gla-OC levels, the carriers of C genotype presented higher values only when considering the analyse for completers (Figure 2).

Analysis of covariance showed significant effect of A carriers of *LEP* polymorphism on variation of circulating levels of glucose (F=4.712, P=0.036), controlling for the variation in Gla-OC, the variation in IL-6, age, average speed and completers. In latter model, the average speed, variation of IL-6 and the

completers were affected by variation of circulating levels of glucose (F=5.578, P=0.023; F=4.340, P=0.043; F=7.112, P=0.011, respectively). Furthermore, analysis of covariance showed significant effect of baseline of skeletal muscle mass on variation of circulating levels of Gla-OC (F=4.650, P=0.037), controlling for the variation in uric acid, creatinine, glucose, age, average speed and completers.

DISCUSSION

Long-term strenuous exercises have recently been linked with serious damage on organs and systems, namely, muscle and ultimately impacting health bone markers. The TransPortugal race is an endurance mountain cycling with a specific magnitude of impact and more important with not-weight-bearing. According with other types of cycling races the impact on bone mineral density (BMD) achievement is quite different. Mountain cycling compared with road cycling included more time spent with two points of contact (hands and feet) rather than three (seat, hands and feet), causing greater loading at the legs through the pedals^{8,25}. Moreover, one point that was missed by Warner group is the impact on lower limbs and spine that could also modulate the BMD. On TransPortugal mountain cycling ultramarathon with a long-term strenuous profile conveys considerable impact on whole body due to frequent striking on hard and irregular surfaces, especially on the lower limbs spine and arms, capable of inducing haemolysis (Isanete A, 2017). Furthermore, the muscle and bone interaction is highly imperative on the metabolic balance. A better understanding of bone metabolism is needed to understand the interaction between bone and muscle because they are currently considered as endocrine organs. Homeostasis of bone tissue is vital for the functionality of the human body, based on its mechanical characteristics, protection and metabolic activity.

First of all, the muscle contraction and the accumulate effects of exercise induces a systemic damage leading to an inflammatory process, influencing immunological and metabolic response, despite athlete's physiological adaptive ability². Muscle contraction and from the inflammatory point-

of-view, the myokine interleukin (IL)-6 released from skeletal muscle displayed the most marked response though to modulate the anti-inflammatory effect of this exercise. In addition to this immediate association, in fact IL-6 has been identified as energy sensor²⁶. IL-6 signalling might have a key role on liver tissue through decreasing the liver glycogen and an increase in response to an exhaustive exercise of the prolonged nature²⁷. This group suggested that during very demanding exercise, muscle-derived IL-6 could help increase hepatic glucose production and adipose tissue fatty acid release to provide sufficient fuel to meet the extra metabolic demand. These effects of IL-6 on the liver and adipose tissue are mediated through the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)²⁸. At TransPortugal race, athletes experienced expected increase after this strenuous exercise, differentiator of completers between non-completers of courses, speed average and associated to muscle damage (uric acid), and insulin regulation (insulin, HOMA- β , HOMA-IR).

Other indicator of muscle damage by excessive muscle contraction was reflected on increased levels of uric acid and creatinine. The uric acid is a reflection of catabolism in skeletal muscle and creatinine that, beyond being involved on protein clearance at renal level, is a product of phosphocreatine degradation at skeletal muscle, which responds to high metabolic demand and ATP production²⁸.

During intense and prolonged exercise, active skeletal muscle is very dependent on carbohydrates to maintain ATP synthesis and skeletal muscle contraction²⁷. The glycogen-breakdown via β -adrenergic receptors and phosphorylation (activation) of glycogen phosphorylase in skeletal muscle during adrenaline stimulation, releases lactate being converted to glucose in the liver (Cori cycle). However, after prolonged exhaustive exercises, the skeletal muscle glycogen content is reduced by 50-70% and the demand for plasma glucose becomes greater, so the ATP resynthesis will be originated from less-rapid catabolism^{1,29,30}.

The increased levels of plasma glucose and insulin resistance (by increased levels of HOMA-IR and lower levels of HOMA- β) observed after TransPortugal race, pinpoint to gluconeogenesis. Even more, and according with nutrient intake, these athletes presented low or insufficient carbohydrate intake, which could perceive the glycolysis as a preferential pathway for fuel supply^{31,32}. This changes on glucose metabolism and production of reactive species of oxygen from lipid intermediates in skeletal muscle may, over time, causes insulin resistance.

When we refer to athletes, who completed the 9 courses of TransPortugal race, we might have an optimal and maximal exercise capacity, with multiple processes occurring simultaneously, namely, a high glycogen content, increased insulin-stimulated glycogen synthesis and increased glycolytic flux.

The strenuous exercises can be deleterious with serious implications not only in muscle but also, bone remodelling. Despite recent findings remains still unclear and controversial, we hypothesize that exercise of impact, like cycling, beyond influencing the metabolic and muscle skeletal profile, represents an important model of profoundly changes in bone metabolism. Notably, load contributes, more than other variables, to important changes on bone anabolism and even more with metabolic interference (*refer*).

Exercise-induced release of IL-6 that is involved on the adaptive effect to exercise in part by driving the generation of bioactive osteocalcin (OC)¹⁵. In addition to its regulation of nutrient uptake and catabolism, osteocalcin signalling in myofibers is also responsible for most of the exercise-induced increase in the circulating levels of IL-6 (**refer**). Hence, a feed forward regulation linking together the endocrine functions of bone and muscle appears to be necessary and sufficient to favour adaptation to exercise.

Bone is an endocrine organ regulating insulin secretion and glucose homeostasis. Bone metabolism is regulated by several hormones, many of them are analyzed here. Insulin drives bone anabolism and a deregulated insulin physiology profoundly affects bone metabolism. Insulin increases

OC synthesis in osteoblast, via Runx2 induction, but it also stimulates osteoclasts, which are involved in OC decarboxylation, by suppressing osteoprotegerin expression in osteoblasts (*refer*). Hence, insulin stimulates bone turnover and Glu-OC release which, in turn, stimulates insulin sensitivity and secretion. The Glu-OC contributes to energy metabolism and glucose homeostasis in mice by acting on islet cells to stimulate β cell proliferation and increase insulin secretion and insulin sensitivity (**refer**).

OC is produced by bone, the carboxylated part (Gla-OC) remains in the bone matrix due to the affinity it has with hydroxyapatite and part is acidified, passing the form Glu-OC, which becomes circulating and acts on the different organs, ie hormonally active ⁷. Although not statistically significant, Gla-OC was slightly increase after the TransPortugal race. Indeed, our major findings from the Gla-OC levels were associated to increased variation for slowest athletes that completed all 9 courses. The real physiological importance of the Gla-OC bone protein is not completely understood, since animal models with gain or loss of its function do not show changes in bone phenotype. In a process of acidification of the bone mineral matrix in the reabsorption lacunae, the carboxylated osteocalcin would lose its glutamic acids.

Could be this an indicator of higher levels of Glu-OC? Many variables could not contribute to the carboxylation of osteocalcin. For instance, the lower levels of Vitamin-K and insulin resistance. If there is a deficiency in substrates or nutrients, this production of osteocalcin may also be compromised. There are two forms that may be responsible for this process, one in which nutrients are insufficiently nutritional, with a real deficit in dietary intake, in specific nutrients that interfere with bone remodelling, such as Calcium, which, in addition to interfering with bone remodelling, In muscle contraction, through actin and myosin and in calcium channels; Of vitamin D3, which acts as a co-adjuvant in the bone metabolism and in the K-Vitamin that acts profoundly in the decarboxylation of osteocalcin.

This decrease in circulating osteocalcin levels occurs at the time the ability of mice to perform exercise declines, and circulating osteocalcin levels do not increase to the same extent in 6- or 12-month-old mice as in 3-month-old mice during exercise¹⁵. Moreover, Comassi *et al.*, 2014 found lower levels in athletes that performed half-Ironman¹⁷. We previously demonstrated that in the absence of load a strenuous endurance activity (*i.e.* *Giro d'Italia*, a major cycling stage race) decreased total OC serum concentrations while it increased the relative Glu-OC fraction.

Also leptin positively regulates bone metabolism directly or through neural circuits and the observed reduction in leptin is consistent with this evidence. Changes in Glu-OC were directly associated with modifications in adiponectin and inversely related to leptin and energy expenditure²⁵. Although the effects on bone metabolism are exerted during long periods of time, the strong effort of a 3-weeks stage race could be sufficient to induce valuable modifications²⁵.

On the other hand, during intense and prolonged metabolic reserves of muscle and liver glycogen, in addition to blood glucose, they are used for the production of ATP or energy for the performance of the essential functions necessary during exercise, and there may still be an insufficient. Nutritional contribution from the nutritional point of view that will definitely interfere in the performance of these athletes ****refer****.

CONCLUSIONS

Though the scientific literature in this field is growing, studies concerning the integrated osteo-metabolic

Future perspectives:

Osteocalcin influences the central nervous system, since its receptors have been identified in the brain ³³. Future studies will provide insight on cognitive performance response to long-term strenuous exercise-associated through osteocalcin effect.

REFERENCES:

- 1 Jensen, J., Rustad, P., Kolnes, A. & Lai, Y.-C. The Role of Skeletal Muscle Glycogen Breakdown for Regulation of Insulin Sensitivity by Exercise. *Frontiers in physiology* **2**, doi:10.3389/fphys.2011.00112 (2011).
- 2 Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature reviews. Endocrinology* **8**, 457-465, doi:10.1038/nrendo.2012.49 (2012).
- 3 Lombardi, G., Sanchis-Gomar, F., Perego, S., Sansoni, V. & Banfi, G. Implications of exercise-induced adipo-myokines in bone metabolism. *Endocrine* **54**, 284-305, doi:10.1007/s12020-015-0834-0 (2016).
- 4 Andreoli, A. *et al.* Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Medicine and science in sports and exercise* **33**, 507-511 (2001).
- 5 Cadore, E. L., Brentano, M. A. & Krueel, L. F. M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **11**, 373-379 (2005).

- 6 Guillaume, G., Chappard, D. & Audran, M. Evaluation of the bone status in high-level cyclists. *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry* **15**, 103-107, doi:10.1016/j.jocd.2011.08.001 (2012).
- 7 Zanatta, L. C. B., Boguszewski, C. L., Borba, V. Z. C. & Kulak, C. A. M. Osteocalcin, energy and glucose metabolism. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **58**, 444-451 (2014).
- 8 Warner, S. E., Shaw, J. M. & Dalsky, G. P. Bone mineral density of competitive male mountain and road cyclists. *Bone* **30**, 281-286 (2002).
- 9 Ostrowski, K., Schjerling, P. & Pedersen, B. K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol* **83**, 512-515, doi:10.1007/s004210000312 (2000).
- 10 Fischer, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise immunology review* **12**, 6-33 (2006).
- 11 Cianferotti, L. & Brandi, M. L. Muscle-bone interactions: basic and clinical aspects. *Endocrine* **45**, 165-177, doi:10.1007/s12020-013-0026-8 (2014).
- 12 Brotto, M. & Johnson, M. L. Endocrine Crosstalk Between Muscle and Bone. *Current osteoporosis reports* **12**, 135-141, doi:10.1007/s11914-014-0209-0 (2014).
- 13 Chen, J. *et al.* Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis. **6**, 36347, doi:10.1038/srep36347; (2016).

- 14 Yu, J. *et al.* In Vitro and In Vivo Evaluation of Zinc-Modified Ca–Si-Based Ceramic Coating for Bone Implants. *PloS one* **8**, e57564, doi:10.1371/journal.pone.0057564 (2013).
- 15 Mera, P. *et al.* Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell metabolism* **23**, 1078-1092, doi:10.1016/j.cmet.2016.05.004 (2016).
- 16 Karsenty, G. & Mera, P. Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle. *Bone*, doi:10.1016/j.bone.2017.04.006 (2017).
- 17 Comassi, M. *et al.* Acute effects of different degrees of ultra-endurance exercise on systemic inflammatory responses. *Internal medicine journal* **45**, 74-79, doi:10.1111/imj.12625 (2015).
- 18 Sansoni, V. *et al.* Bone turnover response is linked to both acute and established metabolic changes in ultra-marathon runners. *Endocrine* **56**, 196-204, doi:10.1007/s12020-016-1012-8 (2017).
- 19 Liu, J.-M., Rosen, C. J., Ducey, P., Kousteni, S. & Karsenty, G. Regulation of Glucose Handling by the Skeleton: Insights From Mouse and Human Studies. *Diabetes* **65**, 3225-3232, doi:10.2337/db16-0053 (2016).
- 20 Sarpeshkar, V. & Bentley, D. J. Adrenergic-beta(2) receptor polymorphism and athletic performance. *Journal of human genetics* **55**, 479-485, doi:10.1038/jhg.2010.42 (2010).
- 21 Lohmann, T. G., Roche, A. F. & Martorell, R. Ch. 15, (1988).

- 22 Lahiri, D. K. & Nurnberger, J. I., Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* **19**, 5444 (1991).
- 23 Alis, R. *et al.* Hemoconcentration induced by exercise: Revisiting the Dill and Costill equation. *Scand J Med Sci Sports* **25**, e630-637, doi:10.1111/sms.12393 (2015).
- 24 Dill, D. B. & Costill, D. L. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **37**, 247-248 (1974).
- 25 Lombardi, G. *et al.* Bone and energy metabolism parameters in professional cyclists during the Giro d'Italia 3-weeks stage race. *PloS one* **7**, e42077, doi:10.1371/journal.pone.0042077 (2012).
- 26 Nimmo, M. A., Leggate, M., Viana, J. L. & King, J. A. The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes, obesity & metabolism* **15 Suppl 3**, 51-60, doi:10.1111/dom.12156 (2013).
- 27 Banzet, S. *et al.* Control of gluconeogenic genes during intense/prolonged exercise: hormone-independent effect of muscle-derived IL-6 on hepatic tissue and PEPCCK mRNA. *J Appl Physiol (1985)* **107**, 1830-1839, doi:10.1152/jappphysiol.00739.2009 (2009).
- 28 Chevion, S. *et al.* Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5119-5123, doi:10.1073/pnas.0831097100 (2003).

- 29 Hermansen, L., Hultman, E. & Saltin, B. Muscle glycogen during prolonged severe exercise. *Acta physiologica Scandinavica* **71**, 129-139, doi:10.1111/j.1748-1716.1967.tb03719.x (1967).
- 30 Karlsson, J. & Saltin, B. Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **31**, 203-206 (1971).
- 31 Jensen, J. *et al.* Muscle glycogen inharmoniously regulates glycogen synthase activity, glucose uptake, and proximal insulin signaling. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **290**, E154-e162, doi:10.1152/ajpendo.00330.2005 (2006).
- 32 Jensen, T. E., Wojtaszewski, J. F. & Richter, E. A. AMP-activated protein kinase in contraction regulation of skeletal muscle metabolism: necessary and/or sufficient? *Acta physiologica (Oxford, England)* **196**, 155-174, doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01979.x (2009).
- 33 Margeli, A. *et al.* Dramatic Elevations of Interleukin-6 and Acute-Phase Reactants in Athletes Participating in the Ultradistance Foot Race Spartathlon: Severe Systemic Inflammation and Lipid and Lipoprotein Changes in Protracted Exercise. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**, 3914-3918, doi:10.1210/jc.2004-2346 (2005).

Figure 1: Haematological and biochemical parameters according to *HMOX1* and *HP* polymorphisms among all athletes that performed the TransPortugal race. Comparison between central tendency

values were done through Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney tests, except for graphs B.1, F.1 and G.1 with ANOVA analysis followed by student-t tests, with values expressed as mean and SEM.

Figure 2: Comparisons of haematological and biochemical parameters according to *HMOX1* and *HP* polymorphisms for athletes who completed all 9-courses (n=37). Comparison between central tendency values were done through Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney tests, except for graphs B.2, C.2, D.2, F.2 and G.2 with ANOVA analysis followed by student-t tests, with values expressed as mean and SEM.

CAPÍTULO IX

-Anexos-

9 ANEXOS

ENT. Nº 1251 DATA: 21/02/13
 DEPARTAMENTO: _____
 DESPACHO: _____
 ARQUIVADO: _____


**PROGRAMA DE CORRIDA
 PROVA ABERTA**

N.º _____ / _____

Exm^{os} Senhores, de harmonia com o R.G.T.C. da U.V.P./F.P.C., pretende-se organizar a seguinte prova:

Organizador: <u>Ciclomotriz Desportos, Lda</u>				
Denominação da prova: <u>Transportugal Garmin em BTT</u>				
Classe	Cat. Corredores	Data da prova	Hora de partida	Quilometragem
<u>XC</u>	<u>+19</u>	de <u>04 MAIO</u> a <u>12 MAIO</u>	<u>7 h 15 m</u>	<u>1200 Km</u> m

Itinerário: Provas de Etapa
 1ª Etapa - Bragança - Treixo de Espada à Cinta
 2ª Etapa - Treixo de Espada à Cinta - Guarda
 3ª Etapa - Guarda - Vinhais Secca
 4ª Etapa - Vinhais Secca - Termas de Montfortinho
 5ª Etapa - Termas de Montfortinho - Castelo de Vide
 6ª Etapa - Castelo de Vide - Monsanto
 7ª Etapa - Monsanto - Albenas
 8ª Etapa - Albenas - Monchique
 9ª Etapa - Monchique - Sagres

Local de Controlo Doping: _____

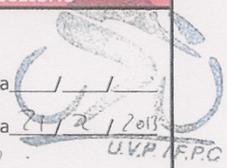
Locais de inscrição: <u>Online site www.transportugal.com</u>	Data limite <u>31.03.2013</u>
--	----------------------------------

Observações: _____

Local e Data <u>Odivelas, 14 de fevereiro, 2013</u>	ASSINATURA DO ORGANIZADOR <u>[Assinatura]</u> <small>(Carimbo ou selo branco)</small>
--	---

Recebido em: _____/_____/_____ Enviado à UVP/FPC _____/_____/_____	ASSOCIAÇÃO CICLISMO DE _____ Parecer do Cons.Reg.Arbitragem _____ Rúbrica _____ O Responsável _____ Data ____/____/_____ <small>(Carimbo ou selo branco)</small>
---	---

UNIÃO VELOCIPÉDICA PORTUGUESA / FEDERAÇÃO PORTUGUESA DE CICLISMO

Data de entrada <u>21/02/13</u>	Registo N.º <u>23</u>
Cons.Arbitragem _____ Rúbrica _____ Data ____/____/_____ Direcção <u>Arbitragem</u> Rúbrica <u>[Assinatura]</u> Data <u>21/2/2013</u>	
Enviado aos interessados em <u>22/02/13</u>	Rúbrica <u>[Assinatura]</u>

CENTRO HOSPITALAR
LISBOA NORTE, EPEHOSPITAL DE
SANTAMARIAHospital
PulidoValente**Consentimento Informado****Fadiga Central variação associada ao Exercício Extremo – Avaliação interindividual em ultramaratonistas de ciclismo de montanha****Declaração de consentimento**

Eu, abaixo assinado, _____ compreendi a explicação que me foi fornecida por _____ (investigador) em relação à investigação em que serei incluído(a). Foi-me dada a oportunidade de fazer perguntas que julguei necessárias e das quais obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento de que, de acordo com a Declaração de Helsíquia, a informação prestada me elucidou sobre os objetivos, os métodos, os benefícios e potenciais riscos, bem como, o eventual desconforto pela participação neste estudo. Além disso, fui informado que tenho o direito de recusar/desistir da minha participação sem que isso implique qualquer prejuízo nos cuidados de saúde que me estão prestados. Os registos dos resultados poderão ser consultados pelos responsáveis científicos e ser alvo de publicação, mas os dados de identidade pessoal serão tratados com confidencialidade.

Deste modo, consinto que me seja aplicado método, tratamento ou inquérito proposto pelo investigador que me apresentou o estudo.

_____, Data ____/____/____

Assinatura do Voluntário

_____, Data ____/____/____

Assinatura do Investigador

COMISSÃO DE
ÉTICA

4

Av. Professor Egas Moniz
1649-035 LISBOA
Tel.: 217 805 000 – Fax.: 217 805 610

www.chln.pt

Alameda das Linhas de Torres, 117
1769-001 LISBOA
Tel.: 217 548 000 – Fax.: 217 548 215

www.chln.pt

