

GUILHERME VANNUCCHI PORTARI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM BENFOTIAMINA NO
EXERCÍCIO FÍSICO: DESEMPENHO E EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS
DO CICLO DE KREBS.**

Projeto de pesquisa submetido ao CNPq para obtenção de
Apoio Financeiro pelo Edital MCTI/CNPq Nº 01/2016 -
CHAMADA UNIVERSAL.

**Pesquisador: Prof. Dr. GUILHERME VANNUCCHI
PORTARI**

UBERABA
2016

1. Introdução

A demanda energética dos treinamentos e competições requer uma dieta balanceada. Sabe-se que uma dieta adequada está diretamente relacionada ao desempenho atlético. A prática de exercícios físicos determina um aumento no gasto calórico, portanto, o aumento no consumo de calorias a fim de promover a melhor recuperação e consequente incremento no desempenho é fundamental para indivíduos engajados em programas de treinamento e competições (ALTHOFF *et al.*, 2009).

A modalidade esportiva executada, a intensidade, volume e frequência do treinamento, o peso e composição corporal, o nível de aptidão física modificam as necessidades energéticas de cada indivíduo, alterando as recomendações nutricionais (SARTORI; PRATES; TRAMONTE, 2002). Entidades competentes como *American Dietetic Association* e *American College of Sports Medicine* estabeleceram padrões de ingestão de nutrientes, com o intuito de orientar a dieta de indivíduos fisicamente ativos e atletas (ACMS, 2016). No entanto, a recomendação dietética de tiamina para atletas não leva em conta as demandas energéticas celulares específicas para estes indivíduos sendo a mesma para a população em geral. Além disso, as metodologias utilizadas para estabelecimento das necessidades de vitamina B1 são limitadas ao conhecimento de décadas atrás.

2. Revisão Teórica

A nutrição constitui uma importante ferramenta na vida de um atleta, auxiliando em um ótimo desempenho físico. Sabe-se que uma dieta adequada está diretamente relacionada com o desempenho do atleta e quando bem orientada pode retardar ou reduzir a fadiga muscular (ALTHOFF *et al.*, 2009). Durante a atividade física intensa deve-se fornecer uma ingestão energética suficiente para suprir as necessidades do corpo, e isso é crucial para promover a apropriada composição corporal e melhorar a recuperação do praticante de exercício físico, para uma consequente melhoria da performance nos treinos (WIERNIUK; WLODAREK, 2013).

A modalidade esportiva executada, o peso, a composição corporal, o nível de aptidão física e outros fatores modificam as necessidades energéticas de cada esportista, alterando as recomendações nutricionais, por isso é imprescindível uma prescrição dietética individualizada para diferentes praticantes de atividade física, lembrando que, as escolhas dos esportistas podem fazer a diferença entre seu sucesso ou fracasso (SARTORI; PRATES; TRAMONTE, 2002). Por exemplo, para Williams e Devlin (1994), em eventos de alta intensidade e longa duração o desempenho é geralmente limitado pela disponibilidade de carboidratos.

Estudos têm demonstrado que a dieta de um atleta é frequentemente desequilibrada, sendo deficiente em macronutrientes como as proteínas e carboidratos (MALINAUSKAS *et al.*, 2006) e, nos micronutrientes como as vitaminas e minerais (PAPANDREOU *et al.*, 2006) e fornecendo consequentemente energia insuficiente (CHRISTENSEN; VAN HALL; HAMBRAEUS, 2002; LOUCK, 2004). Assim, vale ressaltar a importância das vitaminas que são substâncias orgânicas (o que as diferencia dos minerais) essenciais (pois não são sintetizadas pelo organismo) e necessárias em pequenas quantidades (como em miligramas ou microgramas) por dia. Além disso, não fornecem energia diretamente, isto é, seu catabolismo não gera energia.

Dentro da nutrição são reconhecidas treze vitaminas, classificadas de acordo com a sua solubilidade, em dois grupos. As vitaminas solúveis em lipídeos são representadas pelas vitaminas A, D, E e K. E o grupo das vitaminas solúveis em água o qual encontra-se a vitamina C e as vitaminas do complexo B, ou seja, vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), niacina, vitamina B₆, ácido pantotênico, biotina, ácido fólico e vitamina B₁₂.

A redução do desempenho durante o exercício pode não estar necessariamente relacionada à oferta de carboidrato, mas sim a disponibilidade de micronutrientes reguladores do metabolismo glicídico, como por exemplo, a tiamina (HORWITT; KREISLER, 1949; LUKASKI, 2004). A tiamina auxilia também no funcionamento normal do sistema nervoso e muscular. Além disso, o corpo precisa dela para formar o trifosfato de adenosina (ATP), que todas as células do corpo utilizam para gerar energia.

Os alimentos considerados fontes dessa vitamina incluem grãos integrais, carne (especialmente a de porco), vegetais, castanhas, legumes e frutas. (BIESEK, 2005). Quando a ingestão dos alimentos fontes é insuficiente e ocorre a diminuição de tiamina dentro da célula, degrada enzimas de ativação levando a diminuição de ATP e causando a fadiga. (CHOI; SEUNG-HUI; SEUNG-WOOK.,2013)

Os sintomas da deficiência de tiamina incluem dor de cabeça, náuseas, fadiga muscular, irritabilidade, depressão e desconforto abdominal. Além desses sintomas, pessoas com deficiência de tiamina também tem dificuldade para digerir os carboidratos. Isso permite que uma substância chamada ácido pirúvico acumula-se na corrente sanguínea, causando uma perda de agilidade mental, dificuldades respiratórias e problemas gastrointestinais, uma doença conhecida como beribéri (SILVA; COZZOLINO, 2005).

Por prejudicar a conversão de piruvato a acetil CoA, a deficiência dessa vitamina pode afetar o desempenho aeróbio, resultando na elevação das concentrações de lactato intracelular (HORWITT; KREISLER, 1949). Por isso é importante saber que, segundo Padovani (2006), a recomendação do consumo alimentar de tiamina é de 1,2 mg/dia para homens e 1,1 mg para mulheres com idade entre 19 a 50 anos.

A tiamina possui algumas formas como a tiamina livre, tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato (TDP), tiamina trifosfato e adenosil de tiamina (PÁCAL; KATARINA; KATERINA, 2014). A tiamina livre e a TMP circulantes no plasma sob condições normais são ligadas a albumina, quando a capacidade de ligação da albumina é saturada o excesso é rapidamente filtrado pelo glomérulo e excretado pela urina. Embora uma quantidade significativa de tiamina recém-absorvida é fosforilada no fígado, todos os tecidos podem captar tanto tiamina livre quanto TMP sendo capazes de fosforilar para TDP e trifosfato (BENDER, 2003).

A enzima específica tiamina pirodifosfoquinase promove a conversão em TDP que é a forma fisiologicamente ativa, sendo assim, a TDP é co-fator de três enzimas importantes: piruvato desidrogenase (PDH), α -cetoglutarato desidrogenase e transcetolase (Lukaski, 2004; Biesek, 2005). O piruvato-desidrogenase é um complexo enzimático, sendo responsável pela descarboxilação oxidativa do piruvato e consequente formação de acetil-

coenzima A (acetil-CoA) (CHOI; SEUNG-HUI; SEUNG-WOOK., 2013). O TDP também é necessário para a descarboxilação de α -cetoglutarato em succinil-coenzima A, dentro do ciclo de Krebs, favorecendo a oxidação da glicose aeróbia, para obter adenosina trifosfato (ATP), enquanto transcetolase atua na via da pentose fosfato (MANORE, 2000). O principal produto da via da pentose é o NADPH^+ , molécula capaz de gerar energia e com participação fundamental para o adequado funcionamento da via da glutatona, um dos principais mecanismos antioxidantes (BOLAÑOS *et al.*, 2008; YILMAZ *et al.*, 2015).

Segundo Bautista-Hernandez *et al.* (2005), a suplementação de tiamina poderia melhorar a performance física e diminuir a produção muscular de lactato, durante o esforço físico, com isso, a maior disponibilidade de tiamina celular incrementaria muito a conversão de piruvato à acetil - CoA, ressaltando, que é a reação catalisada pela piruvato desidrogenase. Deste modo, a suplementação de tiamina favoreceria o metabolismo aeróbio da glicose.

A deficiência de tiamina provoca o efeito que a suplementação da mesma auxiliaria, ou seja, prejudica o desempenho aeróbio por afetar a conversão de piruvato a acetil- CoA, resultando na elevação das concentrações de lactato intracelular. Essas respostas sob as concentrações de lactato intracelular são utilizadas para a avaliação da capacidade que o indivíduo possui quando é submetido a uma atividade aeróbica de moderada a alta intensidade (BIESEK, 2005).

Outros estudos, utilizando infusão intravenosa, também demonstraram diminuição nas concentrações de lactato sanguíneo, depois do exercício (BAUTISTA-HERNANDEZ *et al.*, 2005). Contrariamente, outro trabalho não observou diferenças na produção de lactato ou no desempenho, com a ingestão oral de tiamina, particularmente em indivíduos bem nutridos (WEBSTER, 1996).

É pertinente saber ainda, que independente da modalidade de atividade física, quando a dieta não atinge quantidades suficientes de carboidrato, pode resultar na diminuição da taxa de oxidação da glicose endógena e no acúmulo de lactato, em resposta ao exercício de moderada ou alta intensidade (ALTHOFF *et al.*, 2009). Por isso é necessário conhecer os hábitos alimentares de cada praticante de atividade física, sendo que atletas com maior risco de deficiência de micronutrientes são aqueles que restringem a ingestão de

energia ou aderem a práticas para perder muito peso, eliminando um ou mais grupos alimentares, consomem dietas ricas em carboidratos e com baixa densidade de micronutrientes.

Existem evidências, que a administração de tiamina (100mg/dia) durante três dias melhora o desempenho do exercício, reduz o lactato no sangue e diminui a fadiga que é induzida pelo próprio exercício. Considerando isso, é possível que a tiamina na sua forma ativa, possa ter efeito sobre os níveis de lactato, provisoriamente, melhorando o desempenho de atletas, além da melhoria na oxidação de carboidratos através do metabolismo aeróbico (CHOI; SEUNG-HUI; SEUNG-WOOK.,2013).

O estresse metabólico gerado durante altas taxas de esforço físico aumenta exponencialmente a produção de radicais livres (RL). Em exercícios de média e longa duração, a elevada demanda energética é suprida principalmente pelo aumento do trabalho mitocondrial, sabidamente a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DAVIES *et al*, 1982). O aumento de RL superior à capacidade antioxidante de enzimas e moléculas destinadas a esta função, representaria um desequilíbrio no estado redox, o que poderia gerar dano oxidativo (COOPER *et al*,2002; CAZZOLA *et al.*, 2003). Devido sua alta reatividade, as EROs causam danos principalmente nos tecidos onde sua produção está elevada, logo, durante o exercício físico, as células musculares e hepáticas estariam mais vulneráveis ao estresse oxidativo (SUN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2007).

Cientes dos malefícios que um desequilíbrio no estado redox poderia gerar a um atleta, estudos têm investigado diferentes maneiras de aumentar a capacidade antioxidante destes indivíduos. Alguns trabalhos têm avaliado o efeito de vitaminas D e E no combate ao dano oxidativo gerado pelo esforço físico, além de verificar as implicações da suplementação com estes nutrientes sobre as adaptações ao treinamento (GOMEZ-CABRERA, *et al*. 2008; YFANTI, *et al.*, 2009). Todavia, pouco se sabe sobre o potencial antioxidante da vitamina B₁ em relação ao exercício físico, embora nosso grupo já tenha demonstrado esse papel em modelo de alcoolismo (PORTARI *et al.*, 2008). O estudo de Wang *et al.* (2007) constatou que a suplementação com vitamina C e tiamina foi eficiente em combater o dano oxidativo hepático e aprimorar o

trabalho de vias antioxidantes com efeito dose-dependente. O trabalho de Yilmaz et al. (2015) verificou potente capacidade antioxidante da TDP no fígado de ratos tratados com etanol, contudo, nenhum trabalho que avaliou os efeitos antioxidantes da tiamina durante o exercício foi encontrado.

Recentemente estudamos em animais a suplementação com um análogo de tiamina em uma condição classicamente estudada por gerar deficiência desta vitamina, i.e., o alcoolismo. Neste estudo verificamos uma biodisponibilidade muito superior da benfotiamina em relação à tiamina, o que resultou em alta taxa de tiamina intracelular no fígado e eritrócitos dos animais estudados (PORTARI; VANNUCHI; JORDÃO, 2013). A benfotiamina é um análogo sintético da tiamina que deve ser administrado por via oral. Após sua ingestão, ela é defosforilada no lúmen intestinal por fosfatases inespecíficas transformando-se em uma substância lipossolúvel, a benzoiltiamina. Por ser lipossolúvel, a benzoiltiamina é fácil e rapidamente absorvida e levada ao fígado onde é transformada em tiamina para ser exportada a todas as células do organismo (PORTARI; VANNUCHI; JORDÃO, 2013).

Em revisão da literatura científica, verificamos a existência de apenas 2 estudos de suplementação com dissulfeto de tetraidrofurfuril de tiamina (WEBSTER *et al.*, 1997; NOZAKY *et al.*, 2009; CHOI; SEUNG-HUI; SEUNG-WOOK., 2013), também um análogo de tiamina, 1 estudo com tiamina (SUZUKI; ITOKAWA, 1996), 2 com TDP intravenosa (BAUTISTA-HERNANDEZ *et al.*, 2005; BAUTISTA-HERNANDEZ *et al.*, 2008), 1 com TDP oral (MEHDI *et al.*, 2013), 2 com alitiamina (WEBSTER, 1998; DOYLE; WEBSTER; ERDMANN, 1997) e 1 trabalho com dicetiamina Shimizu *et al.* (2010). Nenhum estudo até o momento foi realizado com benfotiamina em relação ao exercício físico. No entanto, essa substância já tem sido empregada em ensaios clínicos em doses de 900 mg/dia (3 doses de 300 mg/dia) principalmente em pacientes com complicações do diabetes melitus (ALKHALAF *et al.*, 2010; STIRBAN *et al.*, 2013).

Diante do exposto, pretendemos responder ao seguinte questionamento: a suplementação com vitamina B₁ para atletas é necessária?

Para tanto, propomos dois experimentos independentes sendo um com humanos e outro com animais.

3. Experimento 1

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação de benfotiamina em parâmetros metabólicos e de desempenho aeróbico de corredores amadores de *endurance*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da suplementação com benfotiamina, aguda ou cronicamente, sobre níveis sanguíneos (plasma e eritrócitos) de tiamina livre, monofosfatada e difosfatada;
- Avaliar o efeito da suplementação com benfotiamina, aguda ou cronicamente, sobre os níveis de lactato, após teste de exaustão;
- Avaliar o efeito da suplementação com benfotiamina, aguda ou cronicamente, sobre o desempenho dos atletas;

4. Hipótese

A suplementação de benfotiamina permite melhorar o desempenho físico pelo aumento da produção de ATP.

5. Metodologia

5.1. Caracterização da Amostra e Aprovação Ética

Para o desenvolvimento da pesquisa será necessário um total de 20 corredores amadores saudáveis do sexo masculino, pois possuem menos variações que podem atuar como fatores confundidores quando comparados ao sexo feminino. A faixa etária pré estabelecida será de 19 a 60 anos, sendo justificada por serem adultos e também por serem menos propensos a terem Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) quando comparados a idosos. A frequência média de treino exigida é de 3 vezes por semana e tempo de

prática da modalidade superior à um ano, sendo necessária para que todos os indivíduos tenham as mesmas condições de aptidão física.

Os 20 corredores amadores serão separados aleatoriamente em dois experimentos distintos, com isso o tamanho da amostra calculado para cada grupo com 10 indivíduos, i.e., desvio padrão de 0.16, uma diferença esperada de 0.2, um nível de significância de 5% e poder do teste de 80%.

Este protocolo foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética local sob o protocolo 031359/2015.

5.2. Delineamento Experimental

Trata-se de dois ensaios clínicos aleatorizados, duplo-cegos, com delineamentos crossover (Figura 1). Para tanto, 20 atletas amadores de corridas de longas distâncias serão recrutados. Com isso, no delineamento 1 será analisado a intervenção por período de 1 mês (crônico) e no delineamento 2 será realizado intervenções por período de 2 dias (agudo). Cada delineamento contará com 10 participantes que serão aleatoriamente alocados no período de suplementação ou placebo. A aleatorização será gerada no site <http://www.randomization.com>. Para manter a estratégia de dupla ocultação, somente o coordenador da pesquisa fará o controle dos suplementos, ressaltando-se que o mesmo não tomará parte das intervenções (entrevista, coletas e contatos).

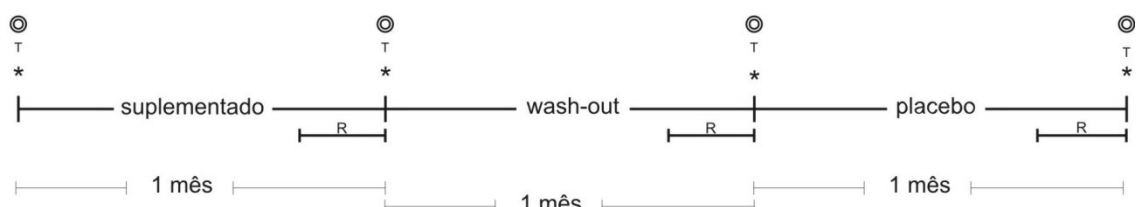
Em um primeiro momento, a equipe de pesquisadores irá ao local de treinamento para esclarecer o protocolo da pesquisa a todos os voluntários. Somente depois desse momento, os corredores que consentirem em participar serão entrevistados individualmente para levantamento de dados que permitam a inclusão/exclusão do voluntário. Após a entrevista, e esperando alcançar o número desejado, os corredores serão alocados aleatoriamente nos dois delineamentos. Antes do início de cada intervenção (suplementação ou placebo), será realizada uma coleta de sangue para avaliar possíveis carryout do washout. Havendo carryout, o participante será mantido em washout e avaliado semanalmente até que retorne aos valores basais.

5.2.1. Descrição dos Delineamentos

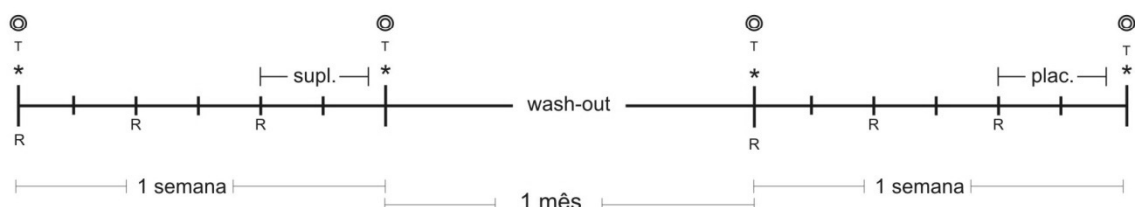
Delineamento 1: 10 corredores amadores irão receber por 1 mês suplementação diária com uma cápsula de benfotiamina (150 mg) ou placebo, conforme sua alocação estabelecida pelo procedimento de aleatorização, e após 1 mês em washout inverterão a intervenção. Antes do início de cada intervenção e ao final do delineamento serão realizados: 1) avaliação antropométrica e nutricional por registro alimentar de 3 dias; 2) teste de VO₂ máximo (BRUCE; KUSUMI; HOSMER *et al.*, 1973) verificando o desempenho dos participantes; 3) coletas de sangue; e 4) determinação do lactato sanguíneo.

Delineamento 2: 10 corredores amadores irão receber suplementação com uma cápsula de benfotiamina (150 mg) ou placebo por 2 dias, conforme sua alocação estabelecida pelo procedimento de aleatorização, e após 1 mês em washout inverterão a intervenção. Neste delineamento, assim como no delineamento 1, antes do início de cada intervenção e ao final do experimento serão realizados: 1) avaliação antropométrica e nutricional por registro alimentar de 3 dias; 2) teste de VO₂ máximo (BRUCE; KUSUMI; HOSMER *et al.*, 1973) verificando o desempenho dos participantes; 3) coletas de sangue; e 4) determinação do lactato sanguíneo.

(A)



(B)



◎ - Avaliação Antropométrica

T - Teste de Exaustão

* - Coleta de Sangue

R - Registro Alimentar de 3 dias

Supl. - Suplementação com Benfotiamina

Plac. - Administração de Placebo

R

Figura 1. Delineamentos Experimentais. (A) Delineamento 1. (B) Delineamento 2.

5.3. Protocolo de Suplementação

A suplementação será fornecida em períodos diferentes nos dois delineamentos, pois tratam-se de protocolos distintos (crônico e agudo), mas é válido ressaltar que ambas as cápsulas serão iguais. Com isso, as cápsulas com a suplementação conterão 150 mg de benfotiamina e o placebo será composto por amido puro o que não acarretará danos a saúde dos voluntários. Todas as cápsulas serão fabricadas pela mesma farmácia de manipulação a qual tomará o devido cuidado para produzir cápsulas idênticas de forma que somente o coordenador da pesquisa fará o controle e identificação dos suplementos e do placebo para preservar o duplo ocultamento.

5.4. Avaliação Antropométrica e Nutricional

A avaliação antropométrica será realizada antes do início de cada intervenção e ao final do delineamento, sendo composta pelas seguintes medidas: peso, altura, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal e dobras cutâneas (tricipital, subescapular, supra-ílica e abdominal).

A avaliação nutricional por registro alimentar de 3 dias não consecutivos será necessária para verificar os hábitos alimentares dos corredores amadores. Os mesmos serão orientados pela colaboradora responsável (nutricionista).

5.5. Protocolo do Teste de Esforço

Para avaliarmos possível melhora no desempenho dos atletas os mesmos serão submetidos a testes de exaustão em esteira ergométrica, no início e ao final dos períodos de suplementação e placebo (vide Figura 1), e terão seus níveis de lactato aferidos antes e após o teste. Para tanto, uma gota de sangue (aproximadamente 25 μ L) será coletada do lóbulo da orelha (padronizada para ser sempre a mesma) e aplicada à tira de dosagem do lactímetro. Será utilizado lancetador fornecido pelo fabricante do lactímetro

para o furo na orelha. As lancetas utilizadas são descartáveis e, portanto trocadas a cada furo.

5.6. Avaliação Sanguínea de Tiamina Livre e suas Formas Fosfatadas

Para a verificação de um esperado aumento das concentrações de tiamina em suas diferentes formas (tiamina livre, mono e difosfatada) no plasma sanguíneo e nos eritrócitos, serão coletadas amostras de sangue venoso. As análises serão realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector fluorimétrico e otimizadas para corrida isocrática com coluna C18 após derivação para tiocromo, seguindo metodologia descrita por Portari, Vannucchi e Jordão. (2013).

6. Análise Estatística

Para a análise dos dados obtidos será realizado teste de normalidade.

Verificada a normalidade dos dados, os períodos serão comparados por análise de variância com medidas repetidas com pós teste de Tukey-Kramer.

Não sendo verificada normalidade dos dados, será utilizado teste de Friedman com pós teste de Dunn.

7. Experimento 2

7.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação de benfotiamina em camundongos sobre o treinamento físico por natação em parâmetros metabólicos e de desempenho.

7.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de enzimas dependentes de tiamina, por meio da análise dos mRNA;
- Avaliar o desempenho dos animais de cada grupo, por meio do tempo de exaustão e do lactato sanguíneo;
- Avaliar parâmetros metabólicos dependentes de tiamina.
- Avaliar o efeito da benfotiamina sobre parâmetros do estado redox nos tecidos muscular e hepático.

8. Animais e Aprovação Ética

De caráter experimental, a pesquisa utilizará um total de 28 camundongos da linhagem BALB/c, machos com quatro semanas de idade. Esta quantidade de animais se faz necessário para a formação de grupos com número suficiente para comparações estatísticas confiáveis. Os animais serão mantidos sob regime circadiano de 12 horas de claro/escuro com água e ração *ad libitum*.

Este projeto foi submetido à avaliação ética pela Comissão de Ética no Uso de Animais e aprovado em reunião de 22/05/2015 sob protocolo número 343/2015.

9. Delineamento Experimental

Após um período de 7 dias de adaptação às condições do Laboratório de Nutrição Experimental, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, os animais serão separados em 4 grupos de acordo com a dieta ofertada (**Tabela**

1) e a prática de exercício físico, formando assim os grupos descritos abaixo e representados na **Figura 2**:

- **Controle Sedentário (CS):** 7 animais que receberão dieta AIN-93 e não farão exercício;
- **Controle com Treinamento Aeróbio (CT):** 7 animais que receberão dieta AIN-93 e farão o protocolo de exercício aeróbio;
- **Benfotiamina Sedentário (BS):** 7 animais que receberão dieta suplementada sem fazer o exercício;
- **Benfotiamina com Treinamento Aeróbio (BT):** 7 animais que receberão dieta suplementada e farão o protocolo de exercício.

A semana 1 (sem1) será destinada a aclimação ao ambiente e ciclo circadiano. A partir da segunda semana (sem 2) os animais iniciarão os treinamentos como descrito posteriormente.

Tabela 1 – Quantidade, em gramas, dos Ingredientes para 1Kg de dieta AIN-93 padrão e suplementada com benfotiamina.

Ingredientes	Controle	Suplementada
Caseína (ptn > 85%) (g)	200	200
Óleo de soja (g)	70	70
Amido de milho dextrinizado (g)	132	132
Sacarose (g)	100	100
Fibra (g)	50	50
Mix mineral (g)	35	35
Mix vitamínico (g)	10	10
L-Cistina	3	3
Colina	2,5	2,5
Benfotiamina (mg)	6	100
Amido de milho (q.s.p.) (g)	397,5	397,4
Aporte calórico (kcal)	3948	3948

Será realizada a pesagem do comedouro uma vez por dia pela manhã e a pesagem dos animais uma vez por semana, durante os dias de repouso. Após a pesagem, as cargas de treinamento serão ajustadas de acordo com as alterações de peso corpóreo dos animais.

10. Protocolo de Treinamento Físico

Os animais serão submetidos a um treinamento de natação, seguindo o protocolo de treinamento proposto por Chen *et al.* (2014). Os animais treinarão em um container de plástico de 20 cm de diâmetro e 40 cm de profundidade preenchida com água de torneira, mantida a 34 °C (± 1 °C) regulada por aquecedor com termostato automático (Hopar SA-333, Zhong Shan, China).

No primeiro dia os animais ficarão por 30 minutos em água rasa (profundidade de 3 cm). No segundo dia os animais treinarão natação por 30 minutos, no terceiro dia por 45 minutos e nos dois dias seguintes as sessões de treinamento terão duração de 60 minutos. A primeira semana de treinamento será sem incremento de carga, sendo esta a semana de adaptação ao treinamento dos animais. Na segunda semana de treinamento (Sem 3) será utilizado um incremento de carga com 1% do peso corporal do animal e da terceira à sexta semana os camundongos treinarão com sobrecarga de 2% do peso corpóreo (CHEN *et al.*, 2014).



Figura 2: Esquema representativo da distribuição dos grupos experimentais. N= amostra.



Figura 3: Linha do tempo do experimento com animais. Y= pesagem; ¥= pesagem e ajuste das cargas de treinamento; X= eutanásia.

Sendo assim, os camundongos serão submetidos a sessões de treinamento físico por natação em uma frequência de cinco sessões por semana, com duração de 60 minutos a sessão, durante cinco semanas consecutivas. Serão treinados 7 animais simultâneo e individualmente. Os camundongos dos grupos sedentários serão mantidos em tanques com água a aproximadamente 1,5 centímetros de profundidade por tempo igual à duração do treinamento dos animais treinados, a fim de mimetizar possível efeito estressante da exposição à água. A sobrecarga será realizada com peso de metal fixado a cauda do animal com fita adesiva.

11. Protocolo de exaustão.

No último dia do protocolo, os animais serão submetidos a um treinamento de exaustão que consiste em sua última sessão de natação com sobrecarga de 5% do peso corpóreo preso à cauda. A exaustão será determinada pela incapacidade do animal manter-se na superfície da água por aproximadamente 7 segundos (CHEN *et al*, 2014).

12. Determinação do Lactato Sanguíneo.

Imediatamente após o protocolo de exaustão, serão coletadas 25 µL de sangue a partir de pequena incisão na cauda do animal, utilizando capilares de vidro heparinizados e previamente calibrados. O sangue coletado será depositado em microtubos com 50 µL de fluoreto de sódio 1%. A mensuração da lactacidemia será realizada por análise eletro-enzimática (lactímetro USI 1500 Sports by Yellow Springs) (GOBATTO *et al*, 2009).

13. Eutanásia e Coleta de Amostras

Após jejum durante 12 horas subsequentes ao protocolo de exaustão, os animais serão anestesiados com Cloridato de Cetamina-Quetamina (90 mg/kg) e Cloridato de Xilazina-Xilazina 2% (12 mg/kg) via intraperitoneal e após a confirmação do estado anestésico por ausência de reflexos caudal e palpebral, será realizada toracolaparotomia para punção cardíaca e exsanguinação do animal. Todos os procedimentos serão realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Medicina Veterinária (CRMV) e as recomendações da Lei nº 11.794, que regulamenta o inciso VII do §1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. O sangue extraído por punção cardíaca em tubos com EDTA será centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Eritrócitos e plasma serão depositados separadamente em microtubos e congelados. Coração, fígado, rins e músculos gastrocnêmios serão imediatamente excisados e lavados em solução fisiológica gelada. Um músculo gastrocnêmio será imerso em solução conservante para análises de RNA mensageiro (RNAm). O restante dos tecidos e órgãos serão submersos em nitrogênio líquido para pronto congelamento e estocados a -20°C para posteriores análises.

14. Quantificação de Expressão Gênica

14.1. Extração do RNA Total

Será avaliado o nível de expressão de RNA das enzimas PDH (Pdha1, Pdha2, Pdhb, Pdhx), α -cetoglutarato desidrogenase (Oggh) e transcetolase (Tkt), através da técnica de Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qRT-PCR) em tempo real.

Para extração do RNA total, serão utilizados 10mg de tecido dos animais dos diferentes grupos em estudo, utilizando método de extração fenol-clorofórmio descrito por Chomczynski & Sacchi (1987), a partir de 1,0 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A integridade do RNA total será avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 3%. O RNA total será quantificado em espectrofotômetro e a absorbância medida nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm, visando avaliação do grau de pureza. Cada

unidade de densidade óptica (DO) equivale a 40 µg de RNA por mL de solução, sendo que a concentração de RNA total será expressa em ng/µL.

Para preservação do RNA, alíquotas das amostras de RNA serão armazenadas em nitrogênio líquido.

14.2- qRT-PCR

O genes alvo das enzimas analisadas serão quantificados por Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa em tempo real (qRT-PCR). Para realização do qRT-PCR é necessário a síntese do DNA complementar (DNAc) a partir do RNA extraído do tecido. O cDNA será sintetizado por meio de transcrição reversa, a partir de 2µg de RNA total do tecido muscular dos camundongos utilizando-se TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit e *primers* específicos, obtidos através do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) (NCBI–NIH,Bethesda,EUA), descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2: Sequência de primers sense e antisense, número de acesso, comprimento total do produto e localização no gene utilizados nas corridas de PCR em tempo real.

Gene	Primer	nº de acesso	Comprimento	Localização
Ogdh	5'TTGCGAATGTGCAACTGGTC3'	NC_000077.6	422	744-763
	5'ATGAGAACCAGCGCTCACAA3'			165-146
Pdha1	5'AGCTGATCCGCCTTTAGCTC3'	NC_000086.7	179	118-137
	5'CCAGCAGTATCTGTGGGGTG3'			296-277
Dlat	5'TGTCTCCCCCAAATCCTCCA3'	NC_000075.6	464	337-356
	5'AGGTGCTCGACTGCCTAAAC3'			493-474
Pdhb	5'GGCCTCGAAGGGATGGTTAC3'	NC_000080.6	309	569-588
	5'CCTAGCGCGTCCACTGTAG3'			877-859
Dld	5'AGGGGGAGTTCTAGGGCTTA3'	NC_000078.6	412	738-757
	5'CTGAAGCCAGGGCAAGATCA3'			149-130
Tkt	5'CTACGCCACCCAGCTACAAA3'	NC_009388.6	253	1054-1073
	5'GTACTGCAGAAGGGCACTGT3'			1306-1287

As reações de qRT-PCR serão realizadas em duplicata, utilizando como método de detecção o TaqMan®, em um aparelho StepOne™ System. Os níveis relativos de transcritos serão determinados utilizando-se 18S RNA ribossômico (18S rRNA) como o gene constitutivo. A termociclagem iniciará após incubação da solução a uma temperatura de 50°C por 2 minutos. Em seguida, a temperatura será elevada até 95°C para dissociação das fitas de DNA, e então reduzida a 60°C para anelamento dos *primers*. A temperatura será então elevada a 72°C, para otimizar a atividade da Taq polimerase. Este ciclo será repetido por 40 vezes.

Antes dos procedimentos, os *primers* serão submetidos a ensaios para otimização dos mesmos, assim como a quantidade de cDNA necessária para as reações de quantificação dos transcritos. Curvas padrão serão pré-determinadas para cada transcrito a fim de definir o valor do limiar de detecção (*threshold*), onde cada reação apresentasse eficiência de torno de 100%. Para a análise da qPCR, será aplicado o método $\Delta\Delta C_t$ a fim de realizar comparação com o grupo controle (calibrador).

15-Quantificação de Ácidos Orgânicos do Ciclo de Krebs

A análise de valores para produtos da glicólise, intermediários do ciclo de Krebs e corpos cetônicos será realizada em amostras de tecidos derivados utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com detecção tanto no modo de varredura como no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM) em um GC-MS Shimadzu QP-5000, segundo metodologia descrita por Hur *et al.* (2014).

Para a derivação das amostras de tecido será adicionada água destilada aos tecidos e estes serão finamente homogeneizados num banho de água e gelo com um homogeneizador tipo ultra-turrax. Após isso, água destilada (500 µL), acetonitrila (500 µL) e padrão interno (PI) (0,2 µg) serão adicionados à alíquota de homogenato (equivalente a 10 mg de tecido), e a mistura será submetida a agitação em vortex (2 min) e centrifugadas (14.000 rpm durante 10 min) para precipitar as proteínas.

O sobrenadante será ajustado a pH 12 com NaOH 5,0 M. Os grupos carbonila serão convertidos em derivados metoxima (MO), por reação com hidrocloreto de metoxiamina (1,0 mg) a 60°C durante 30 min. A mistura de reação será então acidificada a pH 1-2 com uma solução de ácido sulfúrico a 10% saturada com cloreto de sódio e extraída com éter dietílico (3 mL) seguido por acetato de etila (2 mL).

Após a adição de trietilamina (5 µL), os extratos combinados serão evaporados até à secura sob uma corrente suave de nitrogênio (40°C) em um dry block. Adiciona-se aos resíduos tolueno (20 µl) como solvente e N-metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA)+1% tert-butildimetilclorosilano (20 µL) como o reagente de sililação seguido de aquecimento a 60°C durante 30 min para formar derivados metoxima/tert-butildimetilsililados para análise no GC-SIM-MS.

15. Análise Estatística

Para a análise dos dados obtidos será realizado teste de normalidade. Verificada a normalidade dos dados, os períodos serão comparados por análise de variância com medidas repetidas com pós teste de Tukey-Kramer. Não sendo verificada normalidade dos dados será utilizado teste de Friedman com pós teste de Dunn.

16. Orçamento

Este projeto possui financiamento parcial pela FAPEMIG obtido por este Coordenador do projeto via Edital 01/2015 - Demanda Universal (<http://www.fapemig.br/admin/editais/upload/20151215114952-2015-01%20-%20Universal%20Aprovados.pdf>). É importante ressaltar que não há duplicidade nas solicitações e que o montante ora solicitado será complementar ao já obtido.

CAPITAL	Valor
Dry block	R\$ 6.384,53
Regulador para gases especiais	R\$ 1.900,00
Total	R\$ 8.284,30

CUSTEIO	Valor
N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltriflu	R\$ 922,00
METHOXYLAMINE HYDROCHLORIDE, 98%	R\$ 386,00
DIETHYL ETHER, FOR HPLC, >=99,9%, INHIB&	R\$ 262,00
3,4-DIMETHOXYBENZOIC ACID, 99+%	R\$ 449,00
3-HYDROXYBUTYRIC ACID, 95%	R\$ 348,00
PYRUVIC ACID, 98%	R\$ 331,00
LACTIC ACID	R\$ 278,00
SUCCINIC ACID, ANHYDROUS, FREE-FLOWING,	R\$ 165,00
FUMARIC ACID, ANHYDROUS, FREE-FLOWING, &	R\$ 182,00
OXALOACETIC ACID	R\$ 495,00
A-KETOGLUTARIC ACID >= 99,0% (T)	R\$ 193,00
DL-MALIC ACID, REAGENTPLUS(R), >=99%	R\$ 146,00
CIS-ACONITIC ACID	R\$ 753,00
CITRIC ACID	R\$ 86,00
DL-ISOCITRIC ACID TRISODIUM HYDRATE	R\$ 437,00
TERT-BUTYL ACETOACETATE, REAGENT GRADE,	R\$ 270,00
N-ethylmaleimide	R\$ 300,00
o-Phthalaldehyde	R\$ 650,00
Gás hélio Pureza 99,9995%	R\$ 3.298,96
Kits bioquímicos (proteínas totais, lipidograma, glicose)	R\$ 1.300,00
Glutathione Reductase Assay Kit, 96 Well	R\$ 1.791,00
Superoxide Dismutase Assay Kit, 96 Well	R\$ 1.791,00
Glutathione Peroxidase Assay Kit, 96 Well	R\$ 2.245,00
Catalase Assay Kit (without Hydrogen Peroxide), 96 Well	R\$ 2.131,00
Coluna HPLC	R\$ 6.000,00
Coluna GC	R\$ 5.500,00
Reinstalação e manutenção do CG-MS	R\$ 19.000,00
Total	R\$ 49.709,96

Total Capital	R\$ 8.284,30
Total Custeio	R\$ 49.709,96
Total Geral	R\$ 57.994,49

17. Cronograma de Atividades (incluindo dos bolsistas)

As atividades deverão acontecer à partir do primeiro semestre de 2017 e deverão ter término no primeiro semestre de 2019 quando serão apresentados os resultados referentes ao estudo.

Para o desenvolvimento do presente projeto serão executadas tarefas relacionadas no quadro abaixo:

	Descrição	Avaliação	Início	Duração
1	Experimento 1: - protocolo de suplementação	Acompanhamento diário realizado pelo colaborador e coordenador. Ao final desta etapa deve ter sido realizado todo protocolo com todos os participantes.	1º mês	4 meses
2	Experimento 1: análises bioquímicas (tiamina e lactato)	Realizado pelo colaborador, será avaliado semanalmente pela apresentação dos resultados obtidos em reunião	5º mês	4 meses
3	Experimento 1: análise dos dados coletados	Realizado pelo colaborador com orientação do coordenador. Será avaliado mensalmente pela apresentação de gráficos e tabelas.	9º mês	4 meses
4	Experimento 1: redação de dissertação e publicação de artigo	Realizado pelo colaborador com orientação do coordenador. Será avaliado mensalmente pela apresentação da redação.	12º mês	6 meses
5	Experimento 2: aquisição de insumos para realização do protocolo experimental	Realizado pelo coordenador. Terá acompanhamento diário para verificação de chegada dos insumos e efetuar pagamentos.	12º mês	2 meses
6	Experimento 2: realização do protocolo experimental	Acompanhamento diário realizado pelo colaborador e bolsistas de AT e IC. Ao final desta etapa deve ter sido realizado todo protocolo com coleta de material biológico.	14º mês	2 meses
7	Experimento 2: expressão gênica	Realizado pelo colaborador e bolsistas, será avaliado semanalmente pela apresentação dos resultados obtidos em reunião	15º mês	6 meses
8	Experimento 2: Quantificação de Ácidos Orgânicos do Ciclo de Krebs	Realizado pelo colaborador com auxílio do coordenador e bolsista AT, será avaliado semanalmente pela apresentação dos resultados obtidos em reunião	21º mês	4 meses
9	Experimento 2: análise dos dados coletados	Realizado pelo colaborador com orientação do coordenador. Será avaliado mensalmente pela apresentação de gráficos e tabelas.	25º mês	4 meses

10	Experimento 2: redação de dissertação e publicação de artigo	Realizado pelo colaborador com orientação do coordenador. Será avaliado mensalmente pela apresentação da redação.	29º mês	4 meses
11	Finalização do projeto: redação de relatórios e prestação de contas	Realizado pelo coordenador.	33º mês	2 meses

17.1. Cronograma de atividades para bolsista de Apoio Técnico

	Descrição	Avaliação	Início	Duração
1	Experimento 2: aquisição de insumos para realização do protocolo experimental	Realizado pelo coordenador com auxílio do bolsista AT em atividades de pesquisa de preços.	12º mês	2 meses
2	Experimento 2: realização do protocolo experimental	Auxílio no tratamento dos animais. Coleta e devida manipulação e preparação de tecidos e órgãos.	14º mês	2 meses
3	Experimento 2: expressão gênica	Tratamento iniciais dos tecidos à serem analisados	15º mês	6 meses
4	Experimento 2: Quantificação de Ácidos Orgânicos do Ciclo de Krebs	Preparo de amostras e instrumentação do cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas.	21º mês	4 meses
5	Experimento 2: análise de vitamina B1	Preparo de amostras e instrumentação do cromatógrafo à líquido.	25º mês	4 meses
6	Experimento 2: análise de estresse oxidativo	Realizado pelo bolsista IC com auxílio do bolsista AT	15º mês	8 meses

17.2. Cronograma de atividades para bolsista de Iniciação Científica

	Descrição	Avaliação	Início	Duração
1	Experimento 2: realização do protocolo experimental	Auxílio no tratamento dos animais. Coleta e devida manipulação e preparação de tecidos e órgãos.	14º mês	2 meses
2	Experimento 2: análise de estresse oxidativo	Realizado pelo bolsista IC com auxílio do bolsista AT	15º mês	8 meses
3	Experimento 2: análise dos dados coletados e redação de relatório	Realizado pelo colaborador com orientação do coordenador. Será avaliado mensalmente pela apresentação de gráficos e tabelas.	25º mês	2 meses

18. Equipe e Infraestrutura Disponível

Este projeto terá como Coordenador o Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari do Departamento de Nutrição da UFTM. Será pesquisador colaborador

o Prof. Dr. Fábio Lera Orsatti do Departamento de Educação Física da UFTM. Ambos os pesquisadores já possuem projetos e publicações em comum em colaboração pelo Grupo de Pesquisa BioEx (cadastrado no Diretório de Grupos de Pesquisa CNPq). Os colaboradores serão dois alunos de pós-graduação *stricto sensu* em nível Mestrado, à saber: Renata Campos Leão (graduada em Nutrição) e Álisson de Carvalho Gonçalves (graduado em Educação Física).

O projeto será desenvolvido no Laboratório de Nutrologia da UFTM. Tal laboratório conta com equipamentos adquiridos pelos integrantes do Grupo de Nutrologia em outros editais de fomento. Podemos listar 1) cromatógrafo líquido Shimadzu com duplo detector (UV-Vis e fluorescência), 2) cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu (GC17A-QP5000); 3) espectrofotômetro UV-Vis, 4) centrífuga Eppendorf com refrigeração, 5) freezer e refrigerador, 6) banho termostaticado, 7) deionizador de água, 8) pipetadores e 9) vidrarias comuns de laboratório.

As análises de expressão gênica e os testes de esforço serão realizadas Laboratório de Biodinâmica e Desempenho do Programa de Pós-Graduação em Educação Física (PPGEF) da UFTM ao qual o coordenador é credenciado para orientação *stricto sensu*. Tal laboratório possui cicloergômetro e Sistema para PCR em tempo real (StepOne, Life Technologies). No entanto, faltam alguns equipamentos para um trabalho mais acurado que seja mínimo em contaminações, indispensável para o trabalho com expressão gênica. Estes equipamentos estão sendo solicitados neste edital.

Será contrapartida da instituição UFTM a manutenção dos Laboratórios no que diz respeito à maravalha (cama) para alojamento dos animais, além do fornecimento do nitrogênio líquido.

19. Contribuição Almejada

Por limitações éticas, esperamos demonstrar em humanos que doses acima do recomendado para ingestão de tiamina melhoram o desempenho de atletas, ou seja, a recomendação de ingestão é falha. Com a utilização de técnica de biologia molecular em modelo experimental, no qual poderemos ser

mais invasivos, acreditamos que nos levará a um entendimento específico das reais necessidades de vitamina B₁ para este grupo específico e assim gerar discussão para nova recomendação de ingestão desta vitamina. Os resultados gerados, sendo a resposta à nossa questão central positiva ou negativa, terão visibilidade internacional.

Igualmente importante, este projeto produzirá mão-de-obra qualificada, ou seja, dois mestres, além de fortalecer no âmbito Institucional e regional este grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ACMS. Nutrition and athletic performance. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 48, n. 3, p. 543-568, 2016.
- ALKHALAF, A. *et al.* A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial on benfotiamine treatment in patients with diabetic nephropathy. **Diabetes Care**, v.33, n.7, Jul, p.1598-601. 2010.
- ALTHOFF, M. E. S. W. *et al.* Efeito da suplementação de tiamina na concentração de lactato em jogadores de futebol profissional. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva** São Paulo. v. 3. n. 16. p. 277-285.. 2009.
- BAUTISTA-HERNANDEZ, V. M *et al.* Effect of thiamine pyrophosphate on levels of serum lactate, maximum oxygen consumption and heart rate in athletes performing aerobic activity. **The Journal of International Medical Research** v. 36, p. 1220–1226, 2008.
- BAUTISTA-HERNANDEZ, V.M. *et al.* Effects of thiamine pyrophosphate on blood lactate levels in young, sedentary adults undergoing moderate physical activity. **Journal of Exercise Physiology Online**.v. 8, n. 2, p. 24-29, 2005.
- BIESEK, S. **As Vitaminas no Exercício em Estratégias de Nutrição e Suplementação no Esporte**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2005.
- BOLAÑOS, J. P. *et al.* Regulation of glycolysis and pentose–phosphate pathway by nitric oxide: Impact on neuronal survival. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1777, n. 7, p. 789-793, 2008.
- BRUCE, R.A.; KUSUMI, F.; HOSMER, D. Maximal oxygen intake and nomographic assesment of functional aerobic impairment in cardiovascular disease. **Am Heart**, Washingtom. v. 85, n. 4. P. 546 - 552, 1973.
- BUBBER, P. *et al.* Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. **Neurochemistry International**, v. 45, p. 1021–1028, 2004.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p 169-193, 2000.
- CAZZOLA, R. *et al.* Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, 924-930, 2003.
- CHAVES, N. **Nutrição básica e aplicada**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1985.
- CHEN, W-C. *et al.* Whey protein improves exercise performance and biochemical profiles in trained mice. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 46, n. 8, p 1517–1524, 2014

- CHOI, S. k; SEUNG-HUI, B.; SEUNG-WOOK, C. The effects of endurance training and thiamine supplementation on anti-fatigue during exercise. **JOURNAL of Exercise Nutrition and Biochemistry**. v. 17, n. 4, p. 189-198, 2013.
- CHRISTENSEN D.L.; VAN HALL, G.; HAMBRAEUS, L. Food and macronutrient intake of male adolescent Kalenjin runners in Kenya. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 711-717, 2002.
- COOPER, C. E. *et al.* Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transitions**, v. 30, p. 280-285, 2002.
- DAVIES, K. J. A. *et al.* Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982.
- DOYLE, M. R.; WEBSTER, J. M.; ERDMANN, L. D. Allithiamine ingestion does not enhance isokinetic parameters of muscle performance. **International Journal of Sport Nutrition**, v. 7, p. 39-47, 1997.
- GOBATTO, C. A. *et al.* Maximal lactate steady state for aerobic evaluation of swimming mice. **Comparative Exercise Physiology**. v. 6, n. 3; p. 99–103, 2009.
- HORWITT, M.K.; KREISLER, O. The determination of early thiamine-deficient states by estimation of blood lactic and pyruvic acids after glucose administration and exercise. **Journal of Nutrition**. v. 37, n. 4. p. 411-427. 1949
- HUR, H *et al.* Quantitative measurement of organic acids in tissues from gastric cancer patients indicates increased glucose metabolism in gastric cancer. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98581, 2014.
- KAMMERNAN, S.; WASSERMAN, L.; **Seizure disorders**: Part 1. Classification and diagnosis. B. C. med. J.; Vancouver, v.175, p. 99-103, 2001.
- LOUCK, A.B. Energy balance and body composition in sports and exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 22, p. 1–14, 2004.
- LUKASKI, H.C. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. **Nutrition**. v. 20, n. 7-8, p. 632-644, 2004.
- LUKASKI, H.C. *et al.* Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 41, n. 4, p.:810-817, 1985.
- MALINAUSKAS, B. M. *et al.* Dieting practices, weight perceptions, and body composition: a comparison of normal weight, overweight, and obese college females. **Nutrition Journal**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2006.
- MANORE, M. M. Effect of physical activity on thiamine, riboflavin, and vitamin B-6 requirements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 598–606, 2000.

- MEHDI, K. J. R. *et al.* Effect of supplementary consumption vitamin B₁ (thiamine) on blood glucose changes during and after maximal aerobic exercise. **International Journal of Biosciences**, v. 3, n. 7, p. 195-201, 2013.
- NOZAKY, S. *et al.* Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide improves energy metabolism and physical performance during physical-fatigue loading in rats. **Nutrition Research**, v. 29, p. 867–872, 2009.
- PÁCAL, L.; KATARÍNA, K.; KATERINA, K. Evidence for altered thiamine metabolism in diabetes: is there a potential to oppose gluco and lipotoxicity by rational supplementation? **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 3, p. 288-295, 2014.
- PADOVANI, R. M.; *et al.* Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 741-760, 2006.
- PAPANDREOU, D. *et al.* A. Dietary Intake of Elite Athletes. **Aristotle University Medical Journal**. v. 33, n. 1, p. 119-126, 2006.
- PORTARI, G. V. *et al.* Antioxidant effect of thiamine on acutely alcoholized rats and lack of efficacy using thiamine or glucose to reduce blood alcohol content. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.103, n.5, p.482-6. 2008.
- PORTARI, G.V.; VANNUCCHI, H.; JORDÃO, Jr. A. A. Liver, plasma and erythrocyte levels of thiamine and its phosphate esters in rats with acute ethanol intoxication: A comparison of thiamine and benfotiamine administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 48, p. 799–802, 2013.
- ROMIJN, J.A. *et al.* Substrate metabolism during different exercise intensities in endurance-trained women. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 5, p. 1707- 1714. 2000.
- SARTORI, R. F.; PRATES, M. E. F.; TRAMONTE, V. L. G. C. Hábitos alimentares de atletas de futsal dos estados do Paraná e do Rio Grande do Sul. **Revista da Educação Física**. Maringá, v. 13, n. 2, p. 55-62, 2. sem. 2002.
- SATO, A. *et al.* Dietary Thiamin and Riboflavin Intake and Blood Thiamin and Riboflavin Concentrations in College Swimmers Undergoing Intensive Training. **Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, , v. 21, p. 195-204, 2011.
- SHIMIZU, T. *et al.* Anti-fatigue effect of dicethiamine hydrochloride is likely associated with excellent absorbability and high transformability in tissues as a vitamin B 1. **European journal of pharmacology**, v. 635, n. 1, p. 117-123, 2010.
- SILVA, V.L.; COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes: Vitamina B1 (tiamina)**. São Paulo. Manole, p. 321-331. 2005.
- STIRBAN, A. *et al.* A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled trial of 6 weeks benfotiamine treatment on postprandial vascular function and variables of autonomic nerve function in Type 2 diabetes. **Diabet Med**, v.30, n.10, p.1204-8. 2013.

SUN, L *et al.* Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life sciences**, v. 86, n. 1, p. 39-44, 2010.

SUZUKI, M.; ITOKAWA, Y. Effects of thiamine supplementation on exercise-induced fatigue. **Metabolic Brain Disease**, v. 11, n. 1, p. 93-106, 1996.

WANG, C. *et al.* Effect of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 51, n. 6, p. 563-569, 2007.

WEBSTER, J. M. Physiological and performance responses to supplementation with thiamin and pantothenic acid derivatives. **European Journal of Applied Physiology**, v. 77, p. 486-491, 1998.

WEBSTER, J. M., et al. The effect of a thiamin derivative on exercise performance. **European Journal of Applied Physiology**, v. 75, p. 520-524, 1997.

WIERNIUK, A.; WLODAREK, D. Estimation of energy and nutritional intake implementation of young men practicing aerobic sports. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 64, n. 2, 2013.

WILLIAMS, C.; DEVLIN, J. T. **Foods, nutrition and sports performance**. Londres: E & FN SPON, 1994.

YILMAZ, I. *et al.* The effects of thiamine and thiamine pyrophosphate on alcohol-induced hepatic damage biomarkers in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Science**, v. 19, n. 4, p. 664-670, 2015.