

**ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**EFEITOS DA METFORMINA SOBRE A QUALIDADE DO TREINAMENTO,
DESEMPENHO E PARTICIPAÇÃO METABÓLICA DE NADADORES.**

Mestrando: Matheus S. Norberto

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Papoti

Ribeirão Preto

2017

RESUMO

A metformina (MET) apresenta um potencial efeito ergogênico quando administrada em conjunto com exercício físico, sendo benéfica no desempenho por aumentar o tempo até exaustão. Evidências demonstraram que a MET promove um aumento da recuperação após esforços de alta intensidade, o que pode potencializar o desempenho em atividades intervaladas. Neste contexto, a utilização da MET pode ser benéfica para o treinamento de nadadores, que é caracterizado por esforços contínuos de alta intensidade durante a maioria das sessões. Desse modo, o presente estudo investigará os possíveis efeitos da MET sobre a qualidade de uma sessão de treinamento típico (10 x 50 m, em intensidade máxima, separados por 3 min), parâmetros de força em nado atado e a participação metabólica em diferentes provas da natação. Para isso 20 nadadores serão submetidos a um estudo duplo cego e randomizado, participando de dois experimentos dispostos ao longo de 5 semanas. No primeiro experimento será investigado a qualidade (i.e. parâmetros mecânicos, fisiológicos, neuromusculares e desempenho) de uma sessão típica e os efeitos sobre a força durante um esforço máximo de 30s em nado atado. No segundo experimento, o desempenho e a participação metabólica, serão avaliados em esforços de 50, 100 e 400m. As avaliações respeitarão um intervalo mínimo de 72 horas as quais 3 horas antes dos testes os indivíduos administrarão uma cápsula contendo 500mg de MET ou placebo. Os parâmetros analisados na série típica serão tratados por meio do modelo de análise mista, enquanto que outras análises serão realizadas pelo teste *t* de *Student* ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Metformina; Natação; Participação energética; Desempenho; Fadiga neuromuscular

INTRODUÇÃO

Drogas da classe biguanida como a guanidina e fenformina vem sendo estudadas por mais de 50 anos para o tratamento de pacientes que sofrem do distúrbio metabólico: *diabetes mellitus* tipo II (1). Embora inicialmente as drogas biguanidas frequentemente apresentassem um quadro clínico de acidose láctica (2), a metformina (MET), apesar de também pertencer a classe biguanidas (3), passou a ser um dos medicamentos mais usados entre pacientes que apresentavam *diabetes mellitus* tipo II por apresentar menor probabilidade desse quadro de acidose láctica (4).

A MET é um composto hidrofílico que é assimilado por absorção oral, tem sua captação feita por meio do fígado e, posteriormente, excreção realizada pelos rins (5) sem sofrer metabolização (6). Os locais mais comuns onde a MET se acumula, e consequentemente desempenha suas alterações funcionais, são o intestino, o fígado, o tecido muscular e os rins (7), sendo que seu deslocamento venoso é feito em grande parte por transportadores de cátion orgânico (OCT-1) (5).

Em indivíduos insulino-dependentes a MET tem importante função no intestino (8) aumentando a secreção do peptídeo semelhante a glucagon-1 (GLP-1), presente nas células endócrina L, aumentando a captação de glicose, a efetividade da insulina em células beta-pancreáticas e reduzindo a secreção de glucagon das células alfa-pancreáticas (9). Além disso ela também reduz a atividade da enzima dipeptidil dipeptidase-4 (DPP-4), responsável pela degradação de GLP-1 (10).

No fígado a MET diminui a eficácia da produção do glucagon, reduzindo a resposta cíclica da adenosina monofosfato (AMP). Esta resposta reduz a ação da proteína quinase-A (PKA) e consequentemente, anula a fosforilação das proteínas relacionadas ao ciclo do glucagon. Assim, a utilização da MET leva a supressão da gliconeogênese (11).

Estudos apontam para outra alteração proveniente da ingestão da MET nos hepatócitos, essa por sua vez leva o complexo I de respiração mitocondrial a sofrer uma inibição, que resulta no comprometimento parcial da produção de adenosina trifosfato (ATP) e no consequente aumento da razão AMP/ATP (12). Essa razão aumentada, por sua vez causa uma maior ativação na proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (13), promovendo um aumento da efetividade da insulina, reduzindo a taxa de gliconeogênese e glicogenólise (14).

A MET também atua no músculo esquelético, aumentando o recrutamento de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT-4) (4, 15). Essa ação em conjunto com o favorecimento do uso da glicólise e do sistema ATP-fosfocreatina (CP), como via energética, torna o sistema ideal para potencialização da performance (12, 16), principalmente relacionado a exercícios de alta intensidade (17).

Outro efeito proveniente da administração de MET é o aumento do PGC-1 α , proteína co-ativadora responsável por regulação da expressão de enzimas oxidativas em várias células (18). Sua ação afeta diretamente a oxidação de lipídios e a funcionalidade da gliconeogênese (19). Entretanto, o aumento da PGC-1 α proveniente da administração de MET (18), diminui a expressão de enzimas responsáveis pela gliconeogênese (e.g., fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose 6-fosfatase (G6Pase)) (20).

Finalmente, muitos estudos voltam seus esforços para provar os inúmeros benefícios da administração de MET, sendo ela capaz de melhorar os mecanismos de captação de glicose (14, 21), potencializar os efeitos da insulina (22, 23) e suprimir a adipogênese (24). De fato, a MET parece proporcionar uma condição celular propícia para potencialização de desempenho. Entretanto, devemos considerar que o efeito da administração de MET em indivíduos saudáveis ainda é pouco estudado (12, 25-28).

Johnson et al. (26) realizaram um estudo administrando MET em indivíduos saudáveis e encontraram que: após a ingestão de metformina, os participantes apresentaram menores níveis lactacidêmicos durante o exercício contínuo e uma maior média de consumo de oxigênio durante o exercício incremental sem alteração no o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}). Entretanto, a relação entre a MET e o consumo de oxigênio ainda não está bem estabelecido, uma vez que outro estudo em indivíduos saudáveis tenha encontrado diminuição do VO_{2max} (27). Apesar da utilização da avaliação de consumo de oxigênio, ambos estudos não quantificaram a contribuição metabólica durante os esforços, propiciando uma lacuna sobre o funcionamento da via anaeróbia.

Além do consumo de oxigênio, o estudo de Learsi et al. (12), adicionalmente, estabeleceu a participação de cada via metabólica durante um esforço supra-máximo. Neste estudo foi verificado um aumento no tempo até exaustão promovido pela administração de 500 mg de MET em indivíduos saudáveis, o que foi relacionado com o

aumento da contribuição do metabolismo anaeróbio alático (CMAA). Estes resultados podem ser explicados pela capacidade da MET em aumentar as quantidades de ADP e fosfocreatina (29), que estimulam a enzima creatina quinase e, conseqüentemente, favorecem a produção de ATP pelo sistema anaeróbio alático (30).

Embora a administração de MET apresente potencial para a melhora do desempenho aeróbio e anaeróbio em indivíduos saudáveis, poucos estudos investigaram seus efeitos em indivíduos saudáveis (26, 27) e apenas um estudo teve seu foco voltado para o desempenho (12).

Considerando o potencial efeito da MET no campo esportivo, a natação é um esporte que poderia se beneficiar. Sendo uma modalidade caracterizada por diferentes magnitudes de esforços realizados de maneira contínua ou intervalada em diferentes distâncias, a natação induz a participação de diferentes vias metabólicas (31).

Além disso, frequentemente durante os treinamentos aplicados a natação voltada para o rendimento, o nadador é submetido a esforços intermitentes de alta intensidade, onde o metabolismo anaeróbio é predominante durante o exercício, mas a recuperação entre os esforços é realizada pelo metabolismo aeróbio. Assim, teoricamente, a utilização de MET pode apresentar efeitos benéficos tanto para o desempenho específico de uma prova curta na natação competitiva, como para a manutenção dos esforços durante os treinamentos, aumentando a qualidade das séries aplicadas ao longo da temporada.

Com base nas informações apresentadas anteriormente, foi elaborada a seguinte pergunta central:

A MET pode potencializar a qualidade das sessões de treinamento e o desempenho de nadadores?

JUSTIFICATIVA

Estudos apontam que a MET é capaz de estimular inúmeras cascatas sinalizadoras (11, 14, 18, 24) que podem potencializar as respostas dos metabolismos energéticos (13, 32). Se essa lógica se mantiver, espera-se que a administração de MET em nadadores saudáveis resulte em benefícios metabólicos, melhora do desempenho e na manutenção da qualidade das sessões de treinamento realizadas em alta intensidade.

Assim, o presente projeto científico justifica-se pela sua importância em relação as possíveis respostas positivas com o uso da MET e por alguns aspectos inovadores, os quais serão apresentados abaixo.

Estudos sobre a natação

As provas de natação diferenciam-se conforme a distância percorrida, que pode variar entre 50 e 1500 m quando realizada em piscina (33). Considerando os tempos realizados nestas distâncias, podemos observar uma interação entre os metabolismos energéticos, onde as provas de curta duração (i.e., 50 a 100 m) possuem um predomínio anaeróbio e as de média e longa duração (i.e., 200 a 1500 m) são caracterizadas pelo predomínio do metabolismo aeróbio (34, 35). Neste contexto, embora adaptações positivas sejam observadas para ambos os metabolismos, a utilização de MET pode ter diferentes efeitos conforme a distância percorrida durante a prova, o que ainda precisa ser testado experimentalmente.

Embora o desempenho na natação seja caracterizado por esforços contínuos, durante as sessões de treinamento os nadadores são submetidos a esforços intermitentes, frequentemente caracterizados por esforços de alta intensidade, separados por intervalos de recuperação passiva (31). Durante os esforços de alta intensidade, o metabolismo anaeróbio é predominante (36, 37). Entretanto, se os intervalos de recuperação não forem suficientes para a ressíntese do metabolismo alático e para a remoção dos metabólitos provenientes do metabolismo láctico, a contribuição do metabolismo aeróbio (CMA) aumenta durante os esforços, podendo se tornar predominante (37). Além disso, tanto a ressíntese alática como a remoção dos metabólitos lácticos são auxiliados/realizados pelo metabolismo aeróbio (38), demonstrando a importância da via oxidativa para a manutenção do desempenho durante as séries de treinamento aplicadas na natação.

Dentre as séries típicas aplicadas durante os treinamentos em natação, destaca-se as séries para a produção de lactato (Vel-2). Conforme padronizado por Maglischo (31), estas séries possuem um volume entre 200 e 600 m, divididos em esforços de 25 a 100 m. O principal objetivo deste modelo de série é potencializar a via glicolítica, aumentando a captação de glicose e a velocidade da glicólise (31). Entretanto, na prática, uma diminuição de desempenho pode ser observado durante este modelo de

série (39, 40). Neste contexto, a utilização da MET pode ser benéfica para a qualidade deste tipo de série, diminuindo a queda do desempenho ao longo dos esforços.

Desse modo, o presente projeto irá testar a efetividade da MET tanto em melhorar o desempenho como na qualidade de uma série de Vel-2. Para isso, serão investigados os desempenhos de 50, 100 e 400 m, contemplando esforços comumente realizados durante as competições e com predominância anaeróbia e aeróbia (37). Além disso, investigaremos os possíveis benefícios da MET em uma série composta por 10 esforços de 50 m, realizados em máxima intensidade e separados por 3 min de recuperação passiva (31). Com isso, esperamos contribuir significativamente para o conhecimento sobre os possíveis fatores intervenientes no desempenho e treinamento em natação.

Força e parâmetros mecânicos

Diferentemente da corrida, na natação a técnica de nado possui um peso maior para o desempenho (31). Neste sentido, a propulsão na água é dependente tanto da força aplicada como da capacidade do nadador vencer a resistência imposta pela água (33). Com relação a força aplicada, o teste de 30s em nado atado é amplamente utilizado para avaliação deste componente, possibilitando também a avaliação da aptidão anaeróbia do nadador (i.e., força média observada durante todo o esforço) (41). Dentre os índices relacionados a técnica de nado os mais utilizados são: a frequência de braçada, a distância por braçada e o índice de nado, esses podem ser determinados por análises cinemáticas durante a natação.

Conforme apresentado nos tópicos anteriores, é esperado que a administração de MET aumente o ADP livre e outros metabólitos, potencializando a ação da creatina quinase e, conseqüentemente, a CMAA (29, 30, 42). Além disso, a maior captação de glicose sanguínea induzida pela administração de MET pode aumentar também a ativação da via glicolítica, o que é determinante para esforços entre 20 e 60s (38). Desse modo, a MET pode aumentar o desempenho do nadador durante o teste de 30s em nado atado, o que seria relacionado ao aumento do desempenho e também com parâmetros relacionados a mecânica de nado, especialmente a um aumento da distância por braçada.

Entretanto, esta hipótese ainda precisa ser testada experimentalmente. Assim, o presente projeto irá testar as possíveis influências da administração da MET sobre os

parâmetros obtidos com o teste máximo de 30s em nado atado. Além disso, os parâmetros mecânicos serão determinados durante todos os desempenhos e durante a realização da série típica em Vel-2. Estes experimentos buscarão entender as possíveis variáveis relacionadas ao aumento do desempenho induzido pela MET, se este for confirmado.

Parâmetros relacionados a fadiga central e periférica

Teoricamente, a capacidade da MET em potencializar a captação de glicose sanguínea pelo músculo (11, 14), pode atenuar os parâmetros relacionados a fadiga periférica (i.e., falta de substratos energéticos), aumentando a tolerância em exercícios de alta intensidade. Em outras palavras, menores quedas no desempenho do nadador podem ser observadas com a administração da MET, pois o músculo possui uma maior quantidade de substratos energéticos para a contração em exercícios de alta intensidade.

Por outro lado, a maior captação de glicose sanguínea durante o exercício em concomitância com a inibição da gliconeogênese (43), pode aproximar o meio celular a um estado de hipoglicemia, o qual aumentaria a probabilidade de um quadro de fadiga central (i.e., diminuição da ativação dos motoneurônios pelo sistema nervoso central) (44). Assim, podemos esperar tanto um aumento no desempenho pelo “atraso” da fadiga periférica, como uma diminuição da capacidade de exercício causada pela fadiga central.

Consideramos estes dois panoramas fisiológicos plausíveis de ocorrência na prática, o que ainda precisa ser investigado experimentalmente. Outro aspecto inovador do presente projeto será a investigação sobre os parâmetros relacionados a fadiga central e periférica com a administração de metformina. Para isso, aplicaremos a técnica de pulso interpolado – do inglês *Twitch Interpolation* (TI) – que utiliza estimulações elétricas para a determinação dos componentes centrais e periféricos relacionados a fadiga. É importante salientar que esta técnica já foi padronizada e utilizada em estudos anteriores do nosso laboratório (45-47) e atualmente faz parte do projeto regular em vigência 16/12781-5. Mais uma vez, esperamos contribuir para o conhecimento sobre o uso da MET, investigando os possíveis mecanismos envolvidos com a sua administração.

Contribuições energéticas

Embora os mecanismos relacionados a MET tenham sido descritos anteriormente (4-6), poucos estudos investigaram a transferência dos seus efeitos para a bioenergética em indivíduos saudáveis submetidos a diferentes esforços. O presente projeto de pesquisa investigará quais são as possíveis diferenças bioenergéticas observadas com a MET nos esforços de 50, 100 e 400m na natação. Para isso, a CMA, CMAA e a contribuição do metabolismo anaeróbio láctico (CMAL) referentes a esses esforços serão determinadas.

De fato, Learsi et al. (12) observaram um aumento da CMAA com a administração da MET, o que explica o aumento do tempo até a exaustão em um esforço supra-máximo (de 167 ± 32 s para 191 ± 33 s). Entretanto, o tempo de esforço aplicado por estes autores aponta para uma predominância do metabolismo aeróbio, indicando que mais estudos são necessários para a investigação dos efeitos da MET sobre esforços anaeróbios e/ou mistos (~ 50 % anaeróbio e 50% aeróbio). Neste contexto, o presente projeto investigará as possíveis influências da MET sobre as contribuições dos diferentes metabolismos durante um esforço anaeróbio (i.e., 50 m (36)), misto (i.e., 100m(48)) e aeróbio (i.e., 400 m(34)).

OBJETIVO

Investigar se a MET pode potencializar a qualidade das sessões treinamento e o desempenho de nadadores, relacionando os resultados com os índices de força, mecânica de nado, fadiga neuromuscular e as participações energéticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar a fadiga neuromuscular de uma série típica após a ingestão de MET.
- ✓ Avaliar e comparar variáveis de força e potência em nado atado de nadadores quando ingerem MET e placebo.
- ✓ Investigar o efeito da MET no desempenho de nadadores pela alteração de parâmetros mecânicos de nado.
- ✓ Investigar e comparar o efeito da MET na participação metabólica de esforços específicos de prova (50, 100 e 400m).

PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA

A revisão da literatura será realizada semanalmente durante o transcorrer de todo o projeto por meio de uma sintaxe desenvolvida pela plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para responder as perguntas do presente projeto, serão realizados dois experimentos, os quais serão detalhados no delineamento experimental. Previamente aos experimentos, estudos piloto serão realizados para a padronização das técnicas e familiarização dos voluntários com as capsulas de MET ou placebo.

É importante salientar que nosso laboratório já possui os equipamentos necessários para a realização dos protocolos em nado atado, da TI e para as determinações relacionadas as contribuições energéticas. A partir dos dados coletados por este projeto de pesquisa, serão confeccionados trabalhos científicos, os quais serão apresentados em congressos científicos e em forma de artigos submetidos em revistas especializadas. O quadro 1 apresenta o cronograma que será desenvolvido durante o presente projeto.

Quadro 1. Cronograma que será desenvolvido durante o presente projeto.

Atividade / Meses de projeto	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Revisão da literatura/ Elaboração do projeto	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Envio do projeto ao comitê de ética	X								
Agendamento de datas para avaliações e treinos		X							
Realização do piloto e, posteriormente, do protocolo experimental		X	X	X					
Análise estatística e tabulação dos resultados				X	X				
Análise dos resultados e confecção do trabalho final				X	X				
Confecção da dissertação					X	X			
Confecção do relatório final						X	X		
Composição dos trabalhos científicos							X	X	X

MÉTODOS

Participantes

Para ambos os experimentos, o tamanho amostral foi calculado por meio do software G*Power 3.1 (Düsseldorf, Germany), utilizando a diferença no tempo até a exaustão induzida pela MET, observada por Learsy e colaboradores (12). O poder estatístico foi assumido como 95% ($p\text{-valor} < 0,05$) e o tamanho do efeito utilizado foi de 1,02916. Neste modelo estatístico o número de participantes mínimo foi 15 ($t\text{-valor crítico} = 2,14479$). Considerando uma perda amostral de 30%, em ambos os experimentos serão convidados 20 nadadores.

Participarão voluntariamente do estudo nadadores de ambos os gêneros com idade entre 16 e 25 anos. Os critérios de inclusão serão: 1) ter experiência no esporte a três anos ou mais, 2) participar regularmente de competições de nível estadual ou nacional, 3) estar treinando de forma regular nos últimos 2 anos, 4) apresentar um atestado médico que ateste que o participante não apresenta riscos de problemas renais ou hepáticos. Os critérios de exclusão são: 1) ter diabetes mellitus do tipo I ou II 2) apresentar alguma limitação que impeça o protocolo, 3) ter problemas renais e/ou hepáticos ou apresentar pré-disponibilidade para tais, 4) apresentar desconforto gástrico após a ingestão da cápsula.

Importante destacar que embora o local em que as avaliações serão realizadas conte com desfibrilador (DEA FRX Philips), todos os participantes somente serão incluídos ao estudo após apresentação do exame médico assegurando a liberação para prática de atividade física e manifestação por escrito de Termo de Consentimento e/ou Assentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Delineamento experimental

O presente projeto será dividido em dois estudos. Ambos os experimentos serão realizados por meio de um modelo duplo-cego e randomizado, onde os participantes irão ingerir uma capsula contendo 500mg de MET ou placebo antes dos testes. As situações, experimental e placebo, serão separadas por 72 h, respeitando o *wash-out* da MET (3, 5). As capsulas serão administradas 180 min antes da avaliação, respeitando o pico de ação da MET (5, 26). Os participantes serão orientados a ingerir a capsula junto

ou próximo a um período de refeição, e não utilizar nenhum tipo de bebida energética e/ou alcóolica que possa interferir nos resultados. Em todos os experimentos, antes da realização dos testes, os nadadores realizarão um aquecimento de aproximadamente 1000 m, coordenado pelo técnico responsável, o mesmo será repetido de forma idêntica no dia do re-teste.

O primeiro experimento terá o objetivo de investigar a influência da MET na manutenção de uma série típica (Vel-2) e nos parâmetros obtidos pelo teste de 30 s em nado atado (Figura 1). Durante a série típica em Vel-2, os parâmetros relacionados a mecânica de nado, a percepção subjetiva de esforço (PSE) e as concentrações sanguíneas de lactato ($[La^-]$) e glicose ($[Gli]$), serão determinadas. Além disso, a fadiga neuromuscular será avaliada por meio da técnica de TI, sendo aplicada previamente e imediatamente após a série.

Uma semana antes deste experimento, todos os participantes serão familiarizados com a realização da contração voluntária máxima (CVM) e com os estímulos elétricos, ambos necessários para aplicação da TI. Com relação ao teste em nado atado, todos os nadadores apresentam familiarização com este método, participando de monitoramentos e experimentos do nosso laboratório a mais de 3 anos. A Figura 1 demonstra o delineamento experimental do primeiro experimento proposto.

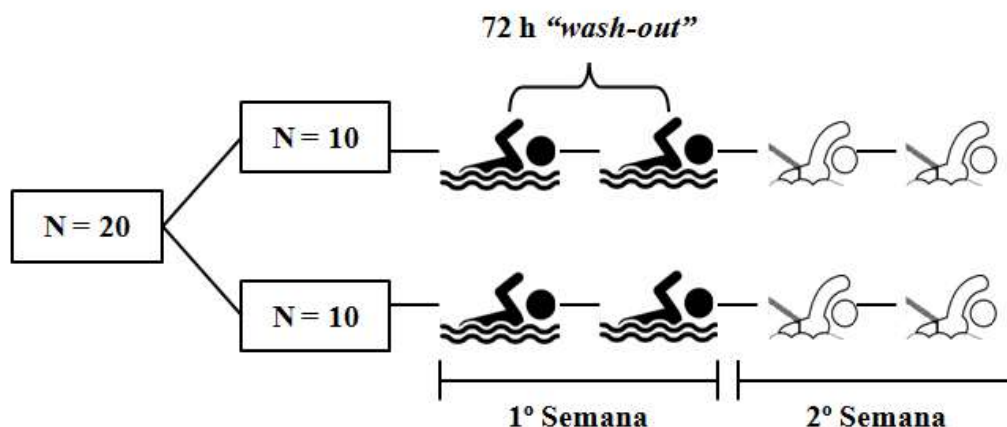


Figura 1. Delineamento experimental do primeiro experimento que será realizado no presente projeto de pesquisa. As sessões de avaliação serão separadas por 72 h para que ocorra o *wash-out* da metformina. : série típica em Vel-2; : teste de 30 s em nado atado.

O segundo experimento investigará a influência da MET no desempenho e na participação metabólica em diferentes esforços. Para isso, serão realizados esforços de 50, 100 e 400m, dispostos ao longo de 3 semanas. Antes dos esforços e durante os primeiros dez minutos de recuperação, serão determinadas as $[La^-]$ e os valores de consumo de oxigênio (VO_2), permitindo a determinação das contribuições dos diferentes metabolismos. A realização dos esforços máximos para estas distâncias com a posterior determinação das $[La^-]$ e do VO_2 , é parte comum do monitoramento realizado pelo nosso laboratório, assim como a realização desta série típica em Vel-2. A Figura 2, demonstra o delineamento experimental do segundo experimento.

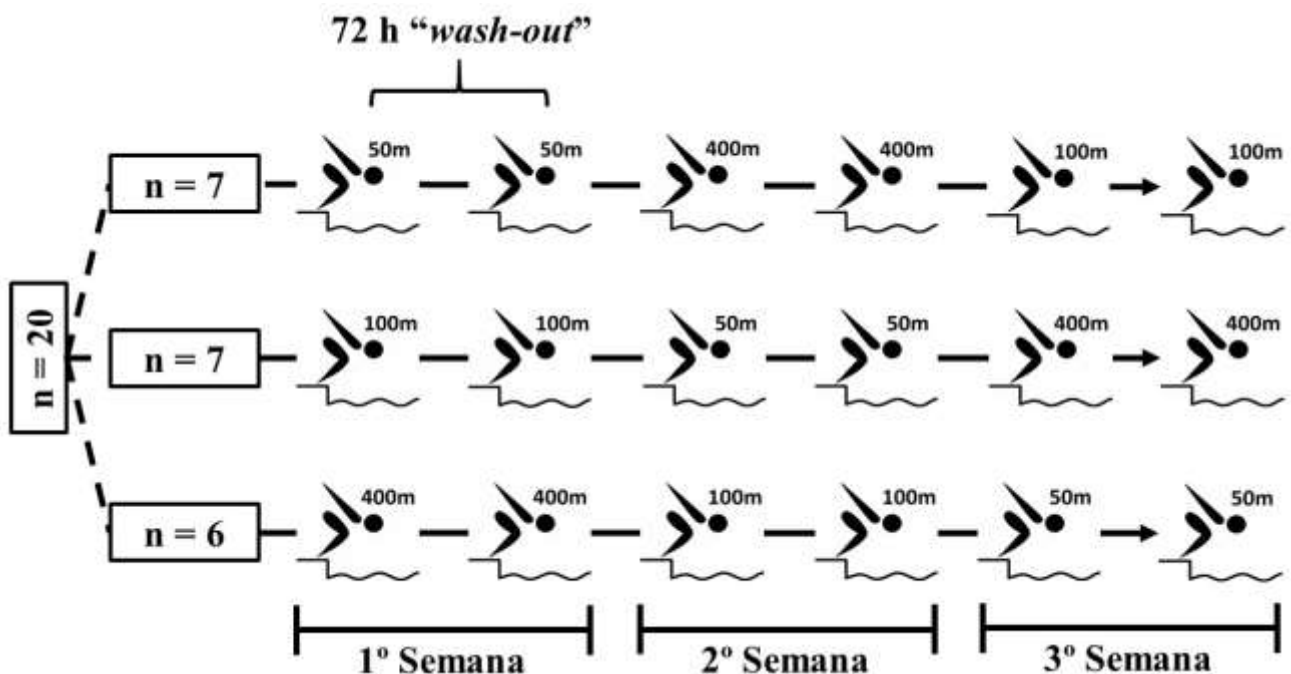


Figura 2. Delineamento experimental para a investigação dos desempenhos e das contribuições energéticas nas diferentes distâncias. Cada distância será realizada duas vezes para testar a efetividade da metformina, utilizando o modelo duplo-cego e randomizado. O intervalo entre cada sessão realizada na mesma semana será de 72 h para o *wash-out* da metformina. : desempenhos nas diferentes distâncias.

Em suma, os riscos de participação neste estudo relacionados a metodologia bem como os esforços exercidos pelos participantes, apesar de raros são inerentes a qualquer prática de atividade física de alta intensidade, tais como os encontrados na rotina diária

de treinamento, como eventuais desconfortos resultantes do estresse físico e psicológico característico da situação de elevada acidose metabólica, como náuseas e cefaleias. Também poderão aparecer hematomas e edemas resultantes das coletas de sangue feitas pelo lóbulo da orelha.

Administração da metformina

Poucos estudos investigaram a administração de metformina em indivíduos saudáveis (12, 25-28), entretanto, considerando seu pico de biodisponibilidade em indivíduos saudáveis situado aproximadamente após duas horas e meia a três horas e meia de sua ingestão (49), o presente estudo visa a utilização desse período ideal em conjunto com a ingestão de 500mg de metformina, uma dosagem que já apresentou benefício no desempenho esportivo (26).

A metformina utilizada será de pureza 99,6% enquanto o placebo terá como composição: Aerosil (1%), celulose microcristalina (10%) e amido – QSP (100%). Ambos conteúdos serão encapsulados em um laboratório especializado neste tipo de processo, o qual usará de capsulas de tamanho 00 (tamanho: 23,3mm; diâmetro: 8,18mm; volume: 95ml; capacidade 950mg) para liberação rápida.

Os efeitos colaterais da ingestão de MET, também descritos nos termos de consentimento e assentimento, são raros, porém compreendem: reações digestivas desagradáveis, náuseas, vômitos, diarreia, dores de cabeça, indigestão, flatulência e astenia. Vale ressaltar que a ocorrência dessas reações pode ser reduzida quando a ingestão ocorre próximo a uma refeição, como será sugerido para os participantes.

A administração de metformina associada com o exercício extenuante pode acelerar o processo de hipoglicemia em alguns casos. Entretanto, além dos níveis glicêmicos serem monitorados antes, durante e após os esforços, durante os experimentos ainda contaremos com uma equipe preparada para dar assistência e, se necessário, fornecer alimentos com alto nível glicêmico para que o quadro seja contido.

Coleta e análise das amostras sanguíneas

Serão determinadas concentrações de: lactato sanguínea ([Lac⁻]) para caracterização dos esforços; e glicose ([Gli]) para análise da resposta glicêmica. Na sessão de 10 x 50m acontecerá coleta no repouso, a cada 100 m completados, e logo

após nos minutos 3, 5, 7 e 10. Na análise de desempenho que contará com análise da contribuição energética a coleta sanguínea acontecerá no repouso e após os minutos 3, 5, 7, 10.

O processo de coleta será feito pelo pesquisador responsável, o qual realizará assepsia com álcool 70% para posterior punção manual do lóbulo da orelha com lanceta picadora (Wiltex) de aço inox, esterilizada com Raio Gamma de uso único. Durante os procedimentos de assepsia, punção manual e coleta das amostras sanguíneas, luvas para procedimento em látex (Lemgruber) serão utilizadas.

Vinte e cinco microlitros (25µL) de sangue serão puncionados do lóbulo da orelha em tubos capilares previamente calibrados e heparinizados. As amostras serão imediatamente depositadas em tubos *Eppendorf* de 1,5mL contendo 50 µl de Fluoreto de Sódio (NaF-1%), para posterior análise da lactacidemia e glicemia em um lactímetro eletroquímico (Yellow Springs Instruments modelo 1500 Sport, Ohaio, USA). Após a determinação das [Lac⁻] e [Gli], as lancetas picadoras e todo o material utilizado durante as coletas serão descartados em coletor de perfuro cortante (Descarpak – 7litros) para posterior depósito em lixo biológico.

Série típica para a produção de lactato

A série que será aplicada no presente projeto é composta por 10 esforços máximos de 50 m, separados por 3 min de intervalo passivo. Esta série está de acordo com os modelos propostos por Maglischo et al. (31), e foi escolhida pela perca de desempenho característica entre os esforços (39, 40). Desse modo, esperamos que os efeitos da MET fiquem evidentes na manutenção do desempenho. As [La⁻], as [Gl] e a PSE, serão determinadas antes da série, a cada 100 m completos e imediatamente após o décimo esforço. Além disso, a TI será aplicada antes da série e no menor tempo possível após o décimo esforço. Estudos piloto do nosso laboratório têm demonstrado que o tempo entre o termino do exercício e os primeiros estímulos da TI, é de aproximadamente 1 min. Os parâmetros mecânicos de nado serão determinados para todos os esforços.

Determinação da fadiga neuromuscular

A determinação da fadiga será realizada por meio da análise de força máxima na contração voluntária máxima (CVM) na extensão de cotovelo e por meio da técnica de pulso interpolado no movimento de extensão de joelho. Essa técnica que já foi usada em artigos anteriores pelo nosso grupo “Grupo de Estudos em Ciências Fisiológicas e Exercício” (GECIFEX) (45-47) e também em outro processo financiado pela FAPESP que está em vigência 16/12781-5.

Para a análise da CVM de extensão de cotovelo os participantes sentarão em uma cadeira específica para essa finalidade onde será acoplada uma cinta de velcro ao pulso direito do participante, em uma posição onde o cotovelo fique flexionado a um ângulo de 90°. A cinta estará ligada a uma célula de carga através de um cano de aço inextensível. O participante realizará o movimento de extensão de cotovelo e a taxa de força será adquirida e posteriormente processada.

Para a técnica de pulso interpolado será realizado a tricotomia e limpeza da pele será por abrasão com álcool 70% onde serão colocados os eletrodos nos pontos anatômicos do músculo *vastus lateralis* para monitoramento dos sinais eletromiográficos (EMG) através de eletrodos devidamente posicionados na região da porção analisada (50). A aquisição do sinal EMG será realizada com uma frequência de 2000 Hz com um ganho de 1000 vezes por meio do software Miograph (Miotec®, Brasil), após a aquisição dos dados, será realizada análise espectral e posteriormente realizado o filtro de acordo com o espectro adotado, enquanto a frequência de corte do sinal EMG será fixada com intervalo de 20-500 Hz.

Os participantes, sentados na mesma cadeira ajustada para análise de força em membro inferiores, realizarão a extensão do joelho direito, a qual será controlada a partir dos mecanismos próprios da cadeira. Para estimulação elétrica no nervo motor (EENM) será utilizado um protótipo de eletroestimulador desenvolvido para essa finalidade com capacidade de 200v pico-a-pico (Bioestimulador, Insight®, Ribeirão Preto – Brasil).

Os eletrodos responsáveis pela descarga elétrica serão posicionados no nervo femoral (cátodo) e na dobra glútea (ânodo) quadríceps femoral, enquanto que uma cinta de velcro será acoplada 2cm acima do maléolo do tornozelo direito, em uma posição em que o joelho e o quadril fiquem em flexão de 90°, a cinta estará ligada a uma célula de

carga por meio de um cano de aço inextensível, os sinais de força serão determinados por meio de uma célula de carga (CSR-1T, MK Controle®, São Paulo, Brasil) e a aquisição dos dados será feita em ambiente Labview 2015® (National Instruments) com frequência de aquisição de 1000Hz.

O procedimento da técnica de pulso interpolado utilizada na extensão de joelho segue três etapas. A primeira etapa da técnica compreende em 2 CVM de duração de 5 segundos com um intervalo de 1 minuto entre cada uma para determinação do pico de força (F_{pico}), a segunda etapa consiste na definição do limiar de estimulação que consiste em aplicar pulsos elétricos duplos (doublets) incrementais (incremento de 10 mA) enviados por meio do eletroestimulador conectado por borrachas condutoras na região do nervo motor, o menor valor onde foi encontrado a maior taxa de força, é denominado limiar de eletroestimulação, considerando que o avaliado pode parar o teste antes de alcançar esse valor de eletroestimulação o limiar de desconforto é assumido como limiar de eletroestimulação (Figura 2) (51).

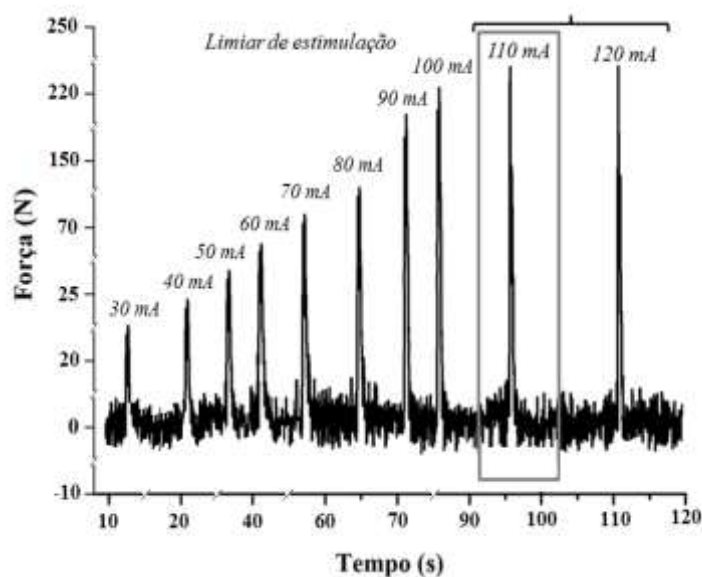


Figura 2. Exemplo de um limiar de estimulação onde o mesmo é assumido como o menor valor onde acontece a maior taxa de força.

A terceira etapa constitui em superestimar o valor de limiar de eletroestimulação em 110%, valor que será utilizado como carga de estimulação a seguir. Nessa etapa

serão realizadas três CVM com intervalo de 1 min entre cada CVM, sendo que a musculatura receberá uma eletroestimulação em nível supramáximo (110%) em dois momentos: relaxada (Twitch Control – TC) e superimpondo uma CVM (Twitch Superimposed – TS) (Figura 3) (46, 52, 53).

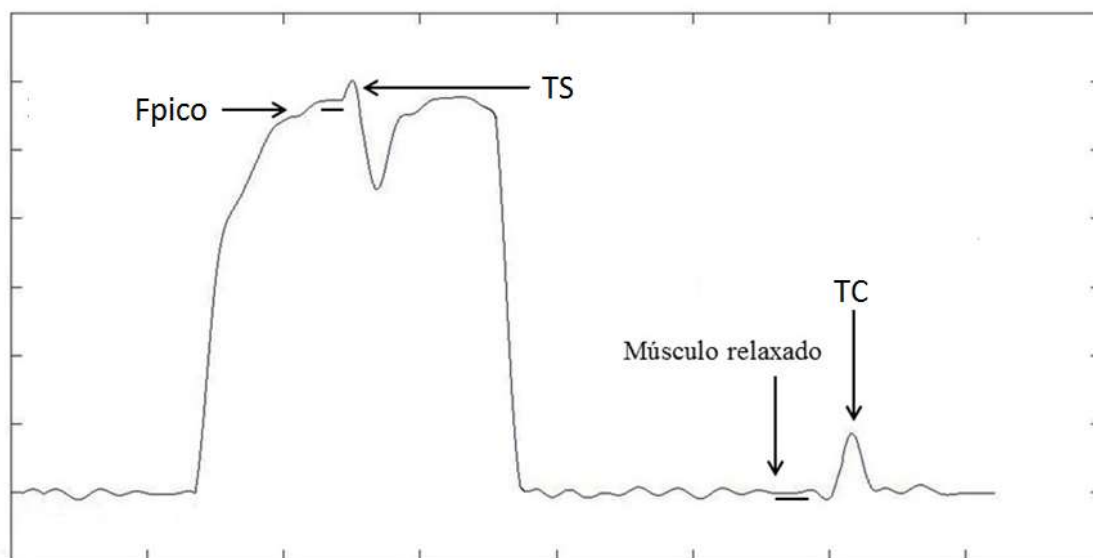


Figura 3. Exemplo de um protocolo de pulso interpolado pelos dados adquiridos da força. Sendo: *Twitch Superimposed* - TS a diferença entre o valor de força durante a primeira eletroestimulação e a média de força que antecede o mesmo (Fpico); *Twitch Control* – TC a diferença entre força durante a segunda eletroestimulação e a média de força que antecede o mesmo (Músculo relaxado).

Os valores de Fpico, TS e TC serão posteriormente utilizados para calcular a porcentagem de ativação voluntária máxima (%AV) do indivíduo dentro da fórmula proposta por Allen et al.⁽⁵⁴⁾ : $\%AV = (1 - (TS \times (\text{nível de força no momento da estimulação} / Fpico) / TC)) \times 100$.

Todos os sinais adquiridos por meio da célula de carga, tanto durante a extensão do joelho como a extensão do cotovelo, serão coletados por uma placa de aquisição de sinais analógico/digital (NI-USB 6009, National Instruments®), amplificados (MKTC5-10 São Paulo, Brasil) e processados em ambiente Labview 2015 (National Instruments®).

Força em nado atado

Para essa análise o avaliado vestirá uma cinta ligada a um cabo inextensível, sistema preso a uma célula de carga (CSR-1T, MK Controle[®], São Paulo, Brasil) fixada no bloco de saída. Os valores de força serão coletados por meio de uma placa de aquisição de sinais analógico/digital (NI-USB 6009, National Instruments[®]). Após a amplificação do sinal (MKTC5-10 São Paulo, Brasil), os dados serão processados em ambiente Labview 2015 (National Instruments[®]). Estes valores serão posteriormente suavizados utilizando o filtro “butterworth” de quarta ordem com frequência de corte de 3 Hz.

O procedimento de coleta terá duração de 30s com início e término controlados por um sinal sonoro (apito). Inicialmente o nadador realizará um esforço de 10s em baixa intensidade para que o cabo seja completamente estendido. Após o sinal sonoro o nadador será orientado a realizar o máximo esforço possível durante os próximos 30s (55). Após desprezar o primeiro segundo de coleta o valor mais alto será considerado força pico (F_p), a média de força durante os 29s restantes será o valor de força média (F_m), a integral obtida da relação força *versus* tempo durante todo o teste será nomeada como impulso (I_m) e o decaimento da força será classificado como índice de fadiga (I_f).

Desempenhos em nado livre

Os nadadores realizarão desempenhos máximos nas distâncias de 50, 100, 400m. Os nadadores serão orientados a realizar as distâncias no menor tempo possível, o que será registrado por meio de cronômetro manual (Kalenji[®] – Onstart 100). Previamente aos esforços e durante os primeiros sete minutos de recuperação, as $[La^-]$, as $[Gl]$ e o VO_2 serão determinados. As variáveis ventilatórias serão analisadas por meio do Quark (PFT, Cosmed, Roma Itália), calibrado conforme as especificações do fabricante antes do início de cada teste. Os valores de VO_2 serão obtidos a cada respiração. Para a determinação dos valores de repouso, o VO_2 será determinado nos 5 min antecedentes ao início dos esforços nas diferentes distâncias. Os valores de VO_2 observados após os esforços, serão obtidos utilizando a técnica de retroextrapolação (56), o que permitirá a determinação dos valores pico de VO_2 (VO_{2PICO}) e da CMAA e CMAL.

Os valores de VO_{2PICO} serão assumidos como o intercepto da regressão linear construída pelos valores de VO_2 nos primeiros 20s de recuperação em função do tempo.

Para a determinação das CMAA, os valores de VO_2 nos sete minutos de recuperação serão ajustados pelo modelo bi-exponencial de decaimento (Equação 1). O produto entre a amplitude (A_1) e o tau (t) será assumido como CMAA (56-58).

Equação 1.

$$\text{VO}_{2(t)} = \text{VO}_{2\text{REP}} + A_1[e^{-(t-\delta)/T_1}] + A_2[e^{-(t-\delta)/T_2}]$$

Onde: $\text{VO}_{2(t)}$ é o consumo de oxigênio no tempo t , $\text{VO}_{2\text{REP}}$ é o consumo de oxigênio em repouso, A é a amplitude, δ é o tempo de atraso, T é a constante tempo (tau) e 1 e 2 são os componentes rápido e lento, respectivamente.

A CMAL é determinada por meio do acúmulo de lactato durante o esforço. Para isso, as $[\text{La}^-]$ serão determinadas no repouso e nos minutos 3, 5, 7 e 10 de recuperação, para a determinação da quantidade de lactato acumulado (i.e., diferença entre a maior concentração observada na recuperação e as concentrações de repouso). Para a determinação da CMAL, uma equivalência metabólica de $3 \text{ mL.O}_2.\text{kg}^{-1}$ para cada 1mM de lactato acumulado será assumida (37).

Análise de parâmetros mecânicos de nado

Durante a série típica e durante os esforços em nas diferentes distâncias os parâmetros mecânicos de nado serão determinados. Para isso, a piscina será calibrada para a determinação dos parâmetros por meio de análise cinemática. Todas as filmagens serão realizadas por meio de uma câmera GoPro Hero³⁺ (Woodman Lab Inc, USA) posicionada a 10 metros da borda lateral da piscina e, posteriormente, os parâmetros serão analisados no software Kinovea (versão 0.8.15). O as marcações será posicionadas a sete metros das bordas da piscina, deixando 11 m para a análise do nado limpo (59). Dentre os parâmetros de nado, o presente projeto determinará o número de braçadas (NB) (59) a frequência de braçada (FB) ($\text{FB} = \text{NB} \cdot \text{tempo}^{-1}$), a distância por braçada (DB) ($\text{DB} = \text{Velocidade} \cdot \text{FB}^{-1}$) e o índice de nado (IN) ($\text{IN} = \text{Velocidade} \cdot \text{CB}$) (59, 60).

Forma de análise dos resultados

A normalidade dos valores será testada por meio do teste de Shapiro-Wilk. A esfericidade será testada pelo teste de Mauchly, sendo corrigida pelo teste de Greenhouse e Geisser, quando necessário. As respostas fisiológicas, neuromusculares e mecânicas observadas durante as séries realizadas com MET ou placebo, serão comparadas por meio do modelo de análise mista, utilizando fatores fixos (i.e., condição [MET ou placebo] e tempo de análise [antes, durante e após o esforço]) e randômicos (i.e., sujeito).

A magnitude das diferenças será evidenciada pelo *et-squared* parcial (η_p^2), podendo ser classificado como pequeno (0.01 – 0.06), moderado (0.061 – 0.14) e grande (> 0.141)(61). As respostas fisiológicas e de desempenho, serão comparadas entre as condições por meio do teste *t* de *student* para amostras dependentes.

Os parâmetros obtidos durante o teste de 30s em nado atado, também serão comparados entre as condições por meio do *t* de *student* para amostras dependentes. Estas análises serão acompanhadas pelo tamanho do efeito, que será classificado como desprezível ($< 0,35$), pequeno (0,35 – 0,79), moderado (0,80 – 1,5) e grande ($> 1,5$) (62). Todos os dados serão tratados por meio do software IBM SPSS® versão 20.0, considerando um nível de significância de $p < 0,05$.

O presente projeto tem como perspectiva, além dos desdobramentos dos experimentos propostos, a confecção de dois artigos principais sendo:

- A influência da metformina na força e na manutenção do esforço em uma série de produção de lactato na natação.
- A influência da metformina sobre o desempenho e a participação metabólica em diferentes distâncias na natação.

REFERÊNCIAS

1. Sterne J. Pharmacology and mode of action of hypoglycaemic guanidine derivatives. *Oral hypoglycaemic agents*. 1969;193-245.
2. Natrass M, Alberti KG. Biguanides. *Diabetologia*. 1978;14(2):71-4.
3. Tucker G, Casey C, Phillips P, Connor H, Ward J, Woods H. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *British journal of clinical pharmacology*. 1981;12(2):235-46.
4. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(9):574-9.
5. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong J, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical pharmacokinetics*. 2011;50(2):81-98.
6. Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical pharmacokinetics*. 1996;30(5):359-71.
7. Wilcock C, Bailey C. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*. 1994;24(1):49-57.
8. Bailey C, Mynett K, Page T. Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. *British journal of pharmacology*. 1994;112(2):671-5.
9. Cho Y, Kieffer T. New aspects of an old drug: metformin as a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) enhancer and sensitiser. *Diabetologia*. 2011;54(2):219-22.
10. Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Bardini G, Mencucci A, Pierazzuoli E, et al. Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 2001;24(3):489-94.
11. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 2013;494(7436):256-60.
12. Learsi S, Bastos-Silva V, Lima-Silva A, Bertuzzi R, De Araujo G. Metformin improves performance in high-intensity exercise, but not anaerobic capacity in healthy male subjects. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2015;42(10):1025-9.
13. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003;144(12):5179-83.
14. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science*. 2012;122(6):253-70.
15. Hundal H, Ramlal T, Reyes R, Leiter L, Klip A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology*. 1992;131(3):1165-73.
16. Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical Journal*. 2000;348(3):607-14.
17. Anantaraman R, Carmines A, Gaesser G, Weltman A. Effects of carbohydrate supplementation on performance during 1 hour of high-intensity exercise. *International journal of sports medicine*. 1995;16(07):461-5.
18. Aatsinki SM, Buler M, Salomäki H, Koulu M, Pavek P, Hakkola J. Metformin induces PGC-1 α expression and selectively affects hepatic PGC-1 α functions. *British journal of pharmacology*. 2014;171(9):2351-63.
19. Handschin C. The biology of PGC-1 α and its therapeutic potential. *Trends in pharmacological sciences*. 2009;30(6):322-9.

20. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413(6852):179-83.
21. Santos R, Nomizo R, Wajhenberg B, Reaven G, Azhar S. Changes in insulin receptor tyrosine kinase activity associated with metformin treatment of type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 1995;21(4):274-80.
22. Wollen N, Bailey C. Metformin potentiates the antigluconeogenic action of insulin. *Diabetes & metabolism*. 1987;14(2):88-91.
23. Wollen N, Bailey CJ. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin: synergism with insulin. *Biochemical pharmacology*. 1988;37(22):4353-8.
24. Chen SC, Brooks R, Houskeeper J, Bremner SK, Dunlop J, Viollet B, et al. Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016.
25. Gudat U, Convent G, Heinemann L. Metformin and exercise: no additive effect on blood lactate levels in healthy volunteers. *Diabetic medicine*. 1997;14(2):138-42.
26. Johnson S, Robert C, Bell G, Bell R, Lewanczuk R, Boulé N. Acute effect of metformin on exercise capacity in active males. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2008;10(9):747-54.
27. Braun B, Eze P, Stephens BR, Hagobian TA, Sharoff CG, Chipkin SR, et al. Impact of metformin on peak aerobic capacity. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2008;33(1):61-7.
28. Malin SK, Stephens BR, Sharoff CG, Hagobian TA, Chipkin SR, Braun B. Metformin's effect on exercise and postexercise substrate oxidation. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*. 2010;20(1):63-71.
29. Vytla VS, Ochs RS. Metformin increases mitochondrial energy formation in L6 muscle cell cultures. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(28):20369-77.
30. Wallimann T. Bioenergetics: Dissecting the role of creatine kinase. *Current Biology*. 1994;4(1):42-6.
31. Maglischo EW, do Nascimento FG. Nadando ainda mais rápido: Manole; 1999.
32. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(1):18-24.
33. Catteau R, Garoff G. O ensino da natação. Manole, editor1990.
34. Ribeiro J, Cadavid E, Baena J, Monsalvete E, Barna A, De Rose E. Metabolic predictors of middle-distance swimming performance. *British journal of sports medicine*. 1990;24(3):196-200.
35. Dekerle J, Brickley G, Hammond A, Pringle J, Carter H. Validity of the two-parameter model in estimating the anaerobic work capacity. *European journal of applied physiology*. 2006;96(3):257-64.
36. di Prampero PE, Ferretti G. The energetics of anaerobic muscle metabolism: a reappraisal of older and recent concepts. *Respiration physiology*. 1999;118(2):103-15.
37. Zamparo P, Capelli C, Pendergast D. Energetics of swimming: a historical perspective. *European journal of applied physiology*. 2011;111(3):367-78.
38. Powers SK, Howley ET, Ikeda M, Navarro F, Bacurau RFP. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho2000.
39. Deminice R, Gabarra L, Rizzi A, Baldissera V. Série de treinamento intervalado de alta intensidade como índice de determinação da tolerância à acidose na predição da performance anaeróbia de natação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2007;13(3):185-9.

40. Calças MADP, Barbieri RA, Alves ARA, Papoti M, Campos EZ, Gobbi RB, et al. Caracterização Fisiológica de Uma Série de Produção e Tolerância à Acidose Para Nadadores. Motriz. 2015.
41. Papoti M, da Silva A, Araujo G, Santiago V, Martins L, Cunha S, et al. Aerobic and anaerobic performances in tethered swimming. *Int J Sports Med*. 2013;34(8):712-9.
42. Saeedi R, Parsons HL, Wambolt RB, Paulson K, Sharma V, Dyck JR, et al. Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;63(6):H2497.
43. Boulé NG, Robert C, Bell GJ, Johnson ST, Bell RC, Lewanczuk RZ, et al. Metformin and Exercise in Type 2 Diabetes Examining treatment modality interactions. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1469-74.
44. Nybo L. CNS fatigue and prolonged exercise: effect of glucose supplementation. *Medicine and science in sports and exercise*. 2003;35(4):589-94.
45. Barbieri R, Barbieri F, Milioni F, Dos-Santos J, Soares M, Zagatto A, et al. Reliability and Validity of a New Specific Field Test of Aerobic Capacity with the Ball for Futsal Players. *International Journal of Sports Medicine*. 2017;38(03):233-40.
46. Milioni F. Associações entre, índices fisiológicos e fadiga neuromuscular com padrões de deslocamento e desempenho do chute de finalização no futsal. Rio Claro, SP: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP; 2014.
47. Andrade VLd. Alterações mecânicas e fisiológicas induzidas por um teste anaeróbio de esforços repetidos de alta intensidade. Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo; 2015.
48. Ogita F, Hara M, Tabata I. Anaerobic capacity and maximal oxygen uptake during arm stroke, leg kicking and whole body swimming. *Acta Physiologica*. 1996;157(4):435-41.
49. Company B-MS, inventor Glucophage (Metformin Hydrochloride Tablets) 2004.
50. Freriks B, Hermens H. European recommendations for surface electromyography: results of the SENIAM project. Torino, Italy: Roessingh Research and Development; 2000.
51. Girard O, Bishop DJ, Racinais S. Neuromuscular adjustments of the quadriceps muscle after repeated cycling sprints. *PloS one*. 2013;8(5):e61793.
52. Gandevia S. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiological reviews*. 2001;81(4):1725-89.
53. Ross EZ, Goodall S, Stevens A, Harris I. Time course of neuromuscular changes during running in well-trained subjects. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(6):1184-90.
54. Allen G, Gandevia S, McKenzie D. Reliability of measurements of muscle strength and voluntary activation using twitch interpolation. *Muscle & nerve*. 1995;18(6):593-600.
55. Papoti M, Martins L, Cunha S, Zagatto A, Gobatto C. Padronização de um protocolo específico para determinação da aptidão anaeróbia de nadadores utilizando células de carga. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*. 2003;3(3):36-42.
56. Bertuzzi RCdM, Franchini E, Ugrinowitsch C, Kokubun E, Lima-Silva A, Pires FdO, et al. Predicting MAOD using only a supramaximal exhaustive test. *International journal of sports medicine*. 2010;31(07):477-81.
57. Kalva-Filho CA, Loures JP, Franco VH, Kaminagakura EI, Zagatto AM, Papoti M. Correlações entre parâmetros aeróbios e desempenho em esforços intermitentes de alta intensidade. Motriz: Revista de Educação Física. 2013:306-12.
58. Kalva-Filho CA, Zagatto AM, Araújo MI, Santiago PR, Da Silva AS, Gobatto CA, et al. Relationship Between Aerobic and Anaerobic Parameters From 3-Minute All-

Out Tethered Swimming and 400-m Maximal Front Crawl Effort. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. 2015;29(1):238-45.

59. Gobbi RB, Papoti M. Determinação de fatores de correção da intensidade de limiar anaeróbio em diferentes séries de treinamento intermitente na natação. Repositório Institucional UNESP: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" 2014.

60. Costill DL. The 1985 CH McCloy research lecture practical problems in exercise physiology research. *Research Quarterly for Exercise and Sport*. 1985;56(4):378-84.

61. Lakens D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Frontiers in psychology*. 2013;4:863.

62. Rhea MR. Determining the magnitude of treatment effects in strength training research through the use of the effect size. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. 2004;18(4):918-20.