



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA

DESAFIOS METODOLÓGICOS NA DEFINIÇÃO DE CARGA DE
TRABALHO E NA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO
INTERVALADO EM MODELO EXPERIMENTAL COM CAMUNDONGOS

Kevin Alves Barreto

BRASÍLIA – DF

2021

DESAFIOS METODOLÓGICOS NA DEFINIÇÃO DE CARGA DE TRABALHO E NA
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO INTERVALADO EM MODELO
EXPERIMENTAL COM CAMUNDONGOS

Kevin Alves Barreto

Trabalho de conclusão de curso destinado ao curso de Educação física Bacharelado da Universidade de Brasília como requisito para aprovação na disciplina: Trabalho de conclusão de curso.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Grossi Porto

Co-orientador: Prof. Me. Edgard de Melo Keene Von Koenig Soares

Brasília – DF

2021

Para Waldiana,

Que é meu exemplo de determinação e
superação, que me apoiou em todos os
momentos e tornou possível que eu
chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Waldiana Cerqueira Barreto, que é certamente a mulher mais forte e batalhadora que eu conheço, que fez tudo o que era possível para que eu tivesse a possibilidade de estudar e chegar a esse momento. Ela me ensinou a ter esperança, me dizendo sempre que, um dia, eu teria tudo o que eu sempre quis ter, que bastava ter paciência e continuar andando nos caminhos certos. À meu pai, Reginaldo Alves Correia, que junto com minha mãe, me educou e sempre me apoiou a ir atrás dos meus sonhos. Às minhas irmãs, minha sincera gratidão pelo carinho, amizade e companheirismo durante todos esses anos.

Aos meus familiares e amigos de infância, os quais tenho a enorme satisfação de poder contar com a presença e a empatia em todos os momentos, seja eles de alegria ou de aflição. Muito obrigado pela compreensão nos períodos de ausência, pelo apoio nas fases difíceis e por compartilhar comigo os melhores momentos vividos até aqui. Em especial, quero agradecer aos meus irmãos de banda, Daniel, Danilo e João, que constantemente me apoiaram e ajustaram diversas vezes os horários de ensaio devido a minha necessidade de tempo para dedicar aos estudos. Além disso, gostaria de agradecer novamente ao Daniel Carvalho de Souza, por todo o suporte com os estudos voltados para o ingresso na UnB, sem todas aquelas conversas e aulas particulares, talvez eu nunca tivesse chegado a esse momento.

À minha companheira, Clara Costa Silva, que sempre me apoiou e me estimulou a fazer o meu melhor, que está comigo em todos os altos e baixos e que torna todos os momentos que dividimos os melhores. Você é sempre um amor novo numa manhã inesperada de um dia qualquer que se torna muito especial.

Meus sinceros agradecimentos aos professores e professoras que passaram pela minha vida me transformando em um cidadão crítico, com a conduta moral voltada ao bem coletivo. Aos professores, Leonardo Moura e Rafael Gauche, muito obrigado por terem sido de grande exemplo na minha formação como profissional e cidadão, agradeço também, pela amizade e pelas conversas e lições que me orientaram e me direcionaram até a UnB. Aos professores, João Prado, Lucas Tessutti e Rodrigo Vanerson, meus sinceros agradecimentos pelo ensino e o compartilhamento de conhecimentos que foram além da sala de aula, que resultou na busca do melhor para minha educação e para minha vida que foi vir para UnB. Muito obrigado por todo o suporte e amizade na vida acadêmica e profissional.

Agradeço ao meu orientador Dr. Luiz Guilherme, por abrir as portas do Grupo de Estudos em Fisiologia e Epidemiologia do Exercício e da Atividade Física (GEAFS) para que eu pudesse conhecer e produzir ciência, por propiciar a participação em diversos projetos e

eventos que me levou a conhecer pessoas que eu jamais um dia pensei conhecer pessoalmente. Agradeço também, por confiar em mim na realização de tarefas desafiadoras. Luiz, você é além de um ser humano especial, é também, um grande líder, um exemplo de empatia e honestidade que inspira a todos com quem você convive. Tenho muito orgulho de ter sido orientado por você. Espero que essa nossa parceria se frutifique, não somente em produções científicas mas também no que diz respeito a momentos de grande felicidade ao longo de toda a totalidade da vida.

Agradeço à Dra. Adriana Lofrano Alves Porto, por abrir as portas do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL) e possibilitar a minha participação no desenvolvimento do doutorado da Ariane, o qual, parte do projeto resultou no meu trabalho de conclusão de curso.

Agradeço ao Dr. Guilherme Eckhardt Molina, por me motivar e compartilhar comigo conhecimentos extremamente complexos de maneira super didática e empolgante. Lembro de quando eu me deslocava de casa para a UnB, para comparecer as reuniões do GEAFS, e que ao final de cada reunião o sentimento era de renovação, eu voltava para casa completamente inspirado e ansioso pela próxima reunião após te ver falar sobre função autonômica cardíaca.

Agradeço ao Dr. Américo Pierangeli, por me ajudar diversas vezes com conselhos valiosos sobre a vida pessoal, acadêmica e profissional, por me ajudar com a resolução de problemas técnicos em horários e dias totalmente aleatórios que sem a ajuda dele eu gastaria muito mais fosfato para conseguir resolver. Muito obrigado pela sua amizade.

Aos meus amigos do meu querido grupo de pesquisa o GEAFS, o qual tenho muito orgulho de fazer parte, muitíssimo obrigado! Vocês são muito mais do que colegas de trabalho, são meus amigos. O cuidado, a atenção e a gentileza, que temos uns com os outros certamente nos tornam um grupo com laços fortes e de característica singular, que demonstra cada vez mais ser capaz de realizar grandes feitos com uma incrível energia de trabalho com diz o Cel. Maciel. Muito obrigado pelos momentos compartilhados nas reuniões e nos congressos. Daniel, Edgard e João, não tenho palavras para descrever o quão grato eu sou pela ajuda e a amizade de vocês. O convívio com vocês me faz aprender mais e mais todos os dias, como estudante e como ser humano. Fico na esperança de um dia poder retribuir da mesma forma.

Finalmente, registro aqui que este trabalho é um braço de um objeto de estudo maior do doutorado da Profa. Me. Ariane B. Frare, sob a orientação do Prof. Dr. Francisco AR. Neves, com colaborações de: Adriana LA. Porto, Sidney A. Pereira, Guilherme R. Vieira, Ana Beatriz S. Sousa e Daniel S. Martin. Agradeço profundamente, por tudo que aprendi com cada um de vocês ao longo do desenvolvimento dessa grande empreitada. Vocês foram essenciais para que tudo o que foi feito até o momento fosse possível. Obrigado!

“Somos todos anjos com uma asa só, e só podemos voar quando abraçarmos uns aos outros.”

LUCIANO CRESCENZO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 GERAL.....	12
2.2 ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 AMOSTRA.....	13
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	14
3.3 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO E TREINAMENTO FÍSICO	15
3.3.1 Familiarização na Esteira	15
3.3.2 Avaliação da capacidade aeróbica	15
3.3.3 Protocolo de treinamento	17
3.4 EUTANÁSIA E PROCEDIMENTOS ÉTICOS	18
3.5 FORMAS DE ANÁLISE	19
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1 ANÁLISE DO VOLUME E INTENSIDADE DO TREINAMENTO	20
4.2 COMPARAÇÃO DOS TESTES NAS TRÊS AVALIAÇÕES	21
4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO.....	26
5. DISCUSSÃO	32
5.1 LIMITAÇÕES	36
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

INTRODUÇÃO: Estudos com modelos animais submetidos a treinamento físico têm sido frequentemente empregados para estudar mecanismos dos efeitos do exercício físico na saúde. Entretanto, desafios metodológicos persistem na busca das melhores formas de se determinar carga de trabalho e formas de avaliar os efeitos do treinamento. **OBJETIVOS:** Avaliar a variação entre três testes consecutivos de capacidade aeróbica em difentes momentos de uma intvenção com treinamento intervalado em camundongos, tanto para a definição de carga de trabalho e quanto dos efeitos do treinamento. Secundariamente, objetivou-se comparar diferentes métricas para avaliação da capacidade física ao longo do treinamento. **MÉTODOS:** 26 camundongos adultos (C57BL/6; 14 fêmeas / 12 machos; 13 semanas de idade), foram submetidos a 3 testes de esforço máximo em um intervalo de 48h para avaliar o desempenho físico máximo estimado pela velocidade e o trabalho máximos, em 3 momentos de um programa de 8 sem de treinamento: pré- (AV1), intermediário (após 4 semanas – AV2) e no término do treinamento (AV3). Os animais foram divididos em grupos de exercício (Fêmea E = 9; Macho E = 7) e grupos controle (Fêmea C = 5; Macho C = 5). Os animais dos grupos exercício realizaram treinamento intervalado de 10 estímulos de 4 min de corrida intercalada por 2 min de descanso ativo (5 m/min), com intensidade inicial de 55-65% até 85-90% da Vmax. Calculou-se o trabalho total (T) com base na distância média dos 3 testes em cada avaliação (T.médio) e na distância máxima atingida em qualquer um dos 3 testes em avaliação (T.máximo). Para as comparações empregaram-se testes de análise de variância (ANOVA 3 x 4), ANOVA one-way e ANOVA one-way para medidas repetidas, todas com post-hoc de Tukey ao nível de 5%. Os dados foram expressos em média \pm DP. **RESULTADOS:** Foram encontradas diferenças significativas nas variações de rendimento entre os 3 testes em cada um dos 3 momentos de avaliação e nos diferentes subgrupos ($p < 0,05$). O teste 2 foi aquele que apresentou maior ocorrência de desempenho máximo, com $55,3 \pm 9,0\%$ dos animais atingindo a maior Vmax. Os grupos macho E e fêmea E melhoraram significativamente o T.médio após 8 semanas ($143,9 \pm 20,7\%$ e $130,8 \pm 32,8\%$; $p < 0,001$, respectivamente). Empregando-se T.máx os respectivos incrementos foram de $160,8 \pm 25,1\%$ e $120 \pm 39,6\%$. **CONCLUSÃO:** Os achados demonstraram variação significativa entre os 3 testes em cada avaliação, indicando a necessidade de mais de um teste para determinar a Vmax. O treinamento intervalado foi capaz de aumentar a capacidade física, seja avaliada pelo T.máximo ou pelo T.médio, em ambos os grupos de exercício.

Palavras-chave: exercício físico; treinamento intervalado; reprodutibilidade; modelo animal

1. INTRODUÇÃO

Os avanços da ciência e da tecnologia observados nas últimas décadas têm colaborado profundamente para discussões mais profundas no campo das ciências da vida, principalmente no que diz respeito à área da biologia molecular. Esse progresso trouxe luz as questões mais obscuras que ficaram durante muito tempo somente no campo das idéias e das especulações (MOSLEY; LYNCH, 2011). Neste cenário, experimentos empregando modelos animais têm sido utilizados amplamente para o estudo de mecanismos de doenças e intervenções terapêuticas com o intuito de reduzir fardo do sofrimento em humanos e conseqüentemente melhorar sua qualidade de vida (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006; FENG *et al.*, 2019; POOLE *et al.*, 2020).

Existem várias razões convincentes para o investigador selecionar um modelo animal alternativamente a estudos com seres humanos, sendo as seguintes as mais importantes: 1 – a existência de grande quantidade de modelos animais para doenças humanas nos quais a duração e a gravidade da doença podem ser controladas; 2 – a possibilidade do emprego de modelos com ausência ou rigoroso controle de vieses confundidores, como tratamentos simultâneos com drogas que podem causar confusão; 3 – um maior controle sobre características da amostra que podem influenciar nos resultados (hábitos, dieta e histórico de exercícios); 4 – a possibilidade de uniformidade na base genética e evolução da doença / aplicação do tratamento; 5 – uma maior possibilidade de aplicação de procedimentos invasivos não aceitáveis em seres humanos, como amostragem de tecidos para análises estruturais, enzimas oxidativas, respirometria e função vascular (POOLE *et al.*, 2020).

O entendimento de diversos conceitos na fisiologia, especialmente no campo da fisiologia do exercício, no que se refere ao conhecimento sobre energia muscular, metabolismo, transporte de O₂ e às bases mecânicas que levam a exaustão, foi significativamente fundamentado em pesquisas com animais (POOLE *et al.*, 2020). Camundongos têm sido empregados com frequência para estudos sobre exercício em várias perspectivas. Desde o sequenciamento do genoma do camundongo (CHINWALLA *et al.*, 2002), é possível indentificar genes que expressam controle ou influência nas respostas e adaptações frente a exposição aguda e crônica ao exercício (HARA *et al.*, 2002; HARRISON *et al.*, 2002).

Protocolos de treinamento físico com modelos animais podem ser implementados de diversas formas. As mais comumente encontradas na literatura são a corrida em esteira elétrica, a roda de exercício de corrida e a natação (JONES, 2007; POOLE *et al.*, 2020). O trabalho em esteira elétrica oferece um maior número de possibilidades de aplicação dos métodos de

treinamento devido a um maior controle das variáveis “volume” e “intensidade” dos esforços, que são fundamentais para o melhor controle da carga de trabalho. Os métodos de treinamento empregados nesses modelos animais que aparecem com maior frequência na literatura são o aeróbico contínuo e o aeróbico intervalado (CHAVANELLE *et al.*, 2017; TOTI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

O treinamento aeróbico contínuo possui como característica principal a manutenção do esforço constante e ininterrupto por um período de tempo prolongado. Já no treinamento aeróbico intervalado, a característica principal é que o esforço é intercalado por intervalos de recuperação. No entanto, para se obter sucesso na aplicação desse método é necessário a realização do exercício em intensidades superiores aquelas trabalhadas no método contínuo (BILLAT, L. V., 2001a, 2001b; BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a, 2013b).

Em seres humanos, ambos os métodos de treinamento provocam grandes melhorias na aptidão cardiovascular mensurada através do VO_2 máx em jovens e adultos de meia-idade saudáveis, porém, os ganhos no VO_2 máx parecem ser ligeiramente maiores com treinamento intervalado quando comparado ao treinamento contínuo (MILANOVIĆ; SPORIŠ; WESTON, 2015). Chavanelle *et al.*, (2017), compararam o efeito de ambos os métodos no controle glicêmico e na função mitocondrial do músculo esquelético em camundongos diabéticos db/db e mostraram que o treinamento intervalado melhorou o metabolismo da glicose de maneira superior, comparativamente ao treinamento contínuo. No entanto, não observaram grandes alterações nas mitocôndrias em nenhum dos grupos treinados. No estudo de Wang *et al.*, (2017), o treinamento intervalado se mostrou superior na redução do peso corporal, na diminuição do acúmulo de lipídios no soro e no fígado, na redução da sinalização inflamatória no tecido adiposo, no aumento da atividade termogênica do tecido adiposo marrom e na indução do "escurecimento" do tecido adiposo branco subcutâneo, quando comparado com o treinamento contínuo, em camundongos com obesidade induzida por dieta. Em um outro estudo comparativo, Toti *et al.*, (2013), mostraram que o treinamento intervalado de alta intensidade produziu alterações bioquímicas e morfológicas específicas nos músculos quadríceps e gastrocnêmio de camundongos, consistindo de alterações na expressão de enzimas mitocondriais específicas e na quantidade de fibras musculares de contração lenta, acompanhados também por uma redução progressiva dos níveis de lactato sanguíneo durante o treinamento, e aumento do peso corporal no final do período de treinamento. Por outro lado, o trabalho de Mileski *et al.*, (2018) comparou o treinamento contínuo com o intervalado, e mostrou que o treinamento contínuo apresentou melhor resposta que o intervalado na melhora

da capacidade cardiorrespiratória e no controle do peso em camundongos com obesidade induzida por dieta.

Para aplicação de ambos os métodos é fundamental que se conheçam parâmetros iniciais sobre os quais serão planejadas as cargas de treino, usualmente baseadas em faixas de intensidade percentuais, relativas ao desempenho pré-treino, da frequência cardíaca, do consumo máximo de oxigênio e/ou da velocidade do desempenho no momento do consumo máximo de oxigênio, entre outros. Esses parâmetros são normalmente obtidos em teste de esforço máximo em período basal (MANN; LAMBERTS; LAMBERT, 2013), e são usados tanto para prescrever os treinos quanto para avaliar os efeitos de um programa de treinamento. Porém, realizar um teste de esforço máximo padrão que possibilite a coleta de todas essas variáveis, tanto em humanos quanto em animais, requer equipamentos sofisticados de alto custo e uma equipe familiarizada e qualificada para o manuseio dos instrumentos, que também exigem calibração periódica. Alternativamente, existem outros métodos, confiáveis, reprodutíveis e de menor custo, como a velocidade máxima atingida durante o teste de esforço incremental (V_{max}), que demonstram validade para a prescrição do treinamento e uma forte correlação com o VO_{2max} , tanto em humanos quanto em animais (HØYDAL *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2013; PICOLI *et al.*, 2018).

Em trabalho anterior realizado por nosso grupo (BARRETO *et al.*, 2020), foi evidenciada a necessidade de protocolos rigorosos, requerendo mais de um teste de esforço máximo na fase pré-treino, para se determinar os valores máximos de capacidade aeróbica antes de intervenções, garantindo assim, uma medida com maior precisão para prescrição da carga de treinamento e avaliação dos efeitos do protocolo de treinamento físico. Contudo, para obter uma estimativa precisa da V_{max} em camundongos alguns desafios metodológicos devem ser levados em consideração, como os aspectos da familiarização dos animais com a esteira e com o teste de capacidade máxima em si. Com isso, torna-se desafiador, obter a medida mais precisa possível dentro de um período de tempo que não promova adaptações de treinamento e, simultaneamente, evite possíveis interpretações errôneas de uma intervenção de treinamento com base em valores basais subestimados. Nesse sentido, este estudo buscou o aprofundamento de questões metodológicas que potencialmente impactam na determinação das cargas de treino e na interpretação dos efeitos de um período de treinamento, conforme se detalha a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a variação entre três testes consecutivos de capacidade aeróbica máxima, em três períodos de avaliação: antes de um período de 8 semanas de treinamento (basal), no meio do período (intermediário) e após 8 semanas de treinamento (final). Avaliar o efeito do treinamento intervalado entre grupos intervenção (exercício) e controle (sem treinamento físico), em camundongos machos e fêmeas, com base em diferentes métricas. Comparar a progressão da carga de treinamento ao longo das 8 semanas de treinamento físico, em camundongos machos e fêmeas.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do treinamento intervalado entre grupos intervenção (exercício) e controle (sem treinamento físico), em camundongos machos e fêmeas, com base no trabalho realizado empregando-se: a) valores médios dos três testes realizados em cada avaliação (T.médio); b) valores máximos da distância aferida nos três testes em cada avaliação (T.máximo), tanto em termos absolutos quanto relativos. Avaliar os indicadores de carga e efeitos do treinamento intervalado entre camundongos machos e fêmeas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é parte de um estudo maior realizado em modelo animal experimental cujo objetivo central é avaliar os efeitos do treinamento físico em diferentes tecidos, órgãos e funções, em associação com hormônios sexuais. Os métodos aqui descritos se referem ao braço do estudo que objetivou avaliar aspectos metodológicos da avaliação física do animais entre o início, o meio e o final do treinamento instituído, como se segue.

3.1 AMOSTRA

Os experimentos foram realizados em um grupo de 26 camundongos C57BL/6 adultos (14 fêmeas / 12 machos) com 13 semanas de idade, pesando $21,1 \pm 1,1$ g (fêmeas) e $25,9 \pm 2,1$ g (machos). Durante o estudo, os camundongos foram divididos em gaiolas com até 5 animais (micro isolador em estante ventilada – Alesco, SP, Brasil), mantidos em ambiente com temperatura controlada ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro a cada 12 horas (escuro entre 18:00 h e 6:00 h), acesso a ração padrão (Nuvilab[®]) e água *ad libitum*. Todas as gaiolas possuíam enriquecimento ambiental (algodão, papel, bastões e canos, higienizados previamente por autoclavagem). O enriquecimento ambiental foi instituído com o objetivo de diminuir o estresse e a monotonia dos animais. A higienização das gaiolas era realizada duas vezes por semana durante todo o experimento. Os animais ficavam em salas de alojamento do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, conforme se observa na Figura 1, onde recebiam visitas diárias da equipe veterinária e dos pesquisadores envolvidos.



Figura 1. Foto ilustrativa do alojamento dos animais no alojamento do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Considerando-se que os animais seriam treinados com base em percentuais de seus desempenhos máximos, os animais foram alocados em grupos com base no melhor desempenho na primeira avaliação da capacidade aeróbica. Esta foi uma estratégia operacional usada para otimizar o tempo de treinamento dos animais, uma vez que aqueles com rendimento semelhante poderiam treinar simultaneamente em uma esteira apropriada com várias raias. Seguindo-se o protocolo do estudo mais amplo, os animais foram divididos em grupo exercício e grupo controle (sem treinamento). Objetivando-se minimizar possível efeito da aprendizagem ao teste de esforço máximo na esteira, todos os animais passaram previamente por um período de familiarização na esteira e em seguida realizaram 3 testes máximos sequenciais com intervalos de 48 horas entre cada teste. Visando homogeneizar características individuais que eventualmente pudessem afetar a adesão ao treino, foram selecionados para participar do grupo exercício, em cada sexo, os animais que atingiram os melhores resultados nos três testes sequenciais iniciais. Para determinar a quantidade de animais em cada grupo, os grupos exercício foram formados com o maior número de animais possíveis, devido à maior suscetibilidade de mortalidade amostral vista no estudo piloto. Por outro lado, para constituir os grupos controle, optamos por formar os grupos com o número mínimo estabelecido pelo cálculo amostral. Na tabela 1 estão descritas as características dos grupos.

Tabela 1. Características dos grupos

Sexo	Intervenção	N de animais	Peso inicial	Peso final	<i>p</i>
Fêmea	Controle	5	20,6 ± 0,9	24,6±1,58 [#]	<0,001
	Exercício	9	21,4 ± 1,1	24,7±1,06 [#]	<0,001
Macho	Controle	5	26,3 ± 2,9	30,5±2,8 [#]	<0,001
	Exercício	7	25,6 ± 1,4	29,5±2,8 [#]	<0,001

Teste t pareado

3.3 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO E TREINAMENTO FÍSICO

3.3.1 Familiarização na Esteira

Duas semanas antes do teste de capacidade aeróbia, todos os animais foram submetidos à familiarização em esteira ergométrica própria para estudos experimentais em camundongos (AVS Projetos®) (Figura 2). Nos 10 dias úteis prévios ao início do experimento, os animais foram expostos ao esforço na esteira, entre 5 a 10 minutos por sessão, com aumentos progressivos na velocidade (de 5 a 15 m / min) e inclinação constante de 25°, seguindo-se recomendações de estudos anteriores (FENG *et al.*, 2019; HØYDAL *et al.*, 2007; LØNBRO *et al.*, 2019; POOLE *et al.*, 2020).

**Figura 2.** Esteira para camundongos (AVS Projetos®).

3.3.2 Avaliação da capacidade aeróbica

A avaliação da capacidade aeróbica foi realizada durante três momentos (avaliações) ao longo do estudo, a saber:

- Avaliação 1: no início do projeto, imediatamente após a fase de familiarização e anterior ao início da fase de treinamento físico;
- Avaliação 2: após 4 semanas do início dos treinamentos físicos;

- Avaliação 3: após 8 semanas de treinamento.

Em cada uma das avaliações os animais foram submetidos a três testes incrementais máximos, com intervalo de 48 horas entre cada teste, com o objetivo de se identificar o maior valor de velocidade de corrida (velocidade máxima) (PICOLI *et al.*, 2018). Os testes eram compostos por 5 minutos de aquecimento em uma velocidade de 6 m/min seguidos de incrementos de 2 m/min de velocidade a cada 2 minutos, com inclinação constante de 25°, até a exaustão (CHAVANELLE *et al.*, 2017; HØYDAL *et al.*, 2007; KEMI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2017).

Os testes foram considerados máximos quando os animais não conseguiam, ou se recusavam a correr, mesmo com estimulação externa. Empregou-se estimulação mecânica, realizada através de toques próximos às patas traseiras com pincéis ou bastões de papel posicionados na parte inferior da raia de corrida no local onde fica a grade de choque (a qual ficou desligada durante toda intervenção), conforme mostrado na figura 3. Optamos por não fazer uso do choque elétrico como estratégia motivacional durante os testes e sessões de exercício porque sua característica de produzir uma resposta emocional repentina pode deixar o animal em estado de pânico e ansiedade (WITKIN; MORROW; LI, 2004). Além dos efeitos estressores indesejáveis para os animais, evitou-se o uso de choque elétrico pois pode causar lesões ao animal, em eventual alteração na calibração do equipamento, e induzir alterações metabólicas não relacionadas ao exercício (CARU *et al.*, 2019; JONES, 2007; LØNBRO *et al.*, 2019). Considerando os valores máximos de velocidade atingidos nos testes, os camundongos com valores semelhantes de velocidade (variação interindividual de 10%) foram treinados durante a mesma sessão treinamento dentro da faixa de intensidade prevista para cada semana.



Figura 3. Foto ilustrativa dos mecanismos de estimulação mecânica dos animais.

3.3.3 Protocolo de treinamento

O treinamento consistiu em 5 minutos de aquecimento a uma velocidade de 5 m/min seguido de 10 estímulos de 4 minutos de corrida em uma intensidade predeterminada para cada fase de treinamento, intercalados por 2 minutos de descanso ativo (5 m/min) o que caracteriza um perfil de treino intervalado do tipo 4:2, adaptado de Wang *et al.*, (2017). Nos 4 minutos de corrida de cada repetição, o primeiro minuto possuía a característica de aceleração, partia-se da velocidade de repouso (5 m/min) e eram adicionados incrementos de 2-3m/min a cada 5-7 segundos até que a velocidade predeterminada para a sessão de treinamento fosse atingida e mantida ao longo do 3 minutos de corrida restantes. A carga aplicada em cada sessão de treino correspondia a uma velocidade percentual da velocidade máxima atingida no teste anterior, começando com percentuais entre 55-65% (conhecida como zona de intensidade referente a máxima fase estável do lactato em camundogos C57BL/6J (FERREIRA *et al.*, 2007) e ao longo das semanas a carga era aumentada em 1 m/min com o objetivo de chegar ao percentual de 85-90% do máximo previamente avaliado. O treinamento físico foi realizado sempre pela manhã, de segunda à sexta-feira. Em todas as sessões de treinamento foram realizadas avaliações quanti-qualitativas sobre o desempenho de cada animal utilizando uma escala do tipo Likert de 4 pontos (1= Não treinou, 2= Treinou, mas necessitando de muito estímulo externo, 3=Treino bem com pouco estímulo externo e 4= Treino bem sem necessidade de estímulo externo). A carga de treino de cada grupo só era incrementada caso a maioria dos animais recebessem nota maior que 3 na avaliação individual por sessão.

Após 20 sessões de treinamento foi realizada a segunda avaliação periódica da capacidade aeróbica para avaliar a progressão e realizar o ajuste das cargas de intensidade do

treino. A terceira e última semana de avaliação foi realizada após as 40 sessões de treinamento (8 semanas) para comparação dos efeitos do treinamento. Após a última avaliação da capacidade aeróbica os animais realizaram mais 5 sessões de treinamento intervalado com o objetivo de manter a expressão gênica característica do período de treino visando aos objetivos do estudo principal. Nessa semana foi mantida a carga de treino realizada anterior à última avaliação.

3.4 EUTANÁSIA E PROCEDIMENTOS ÉTICOS

A eutanásia foi realizada 24 h após a última sessão de treinamento físico. Os animais foram eutanasiados com procedimento padrão, com uso do fármaco isofluorano (Forane, Abbott, Brasil). Em seguida, os animais foram decapitados utilizando tesoura cirurgica comercial, seguindo-se protocolos padronizados e aprovados para este procedimento. Em seguida foi coletado o sangue do tronco e os tecidos de interesse que foram dissecados, pesados e armazenados a -80°C para análise posterior no estudo principal.

Todos procedimentos realizados durante o estudo foram previamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (Processo nº.: 23106.012677/2019-26).

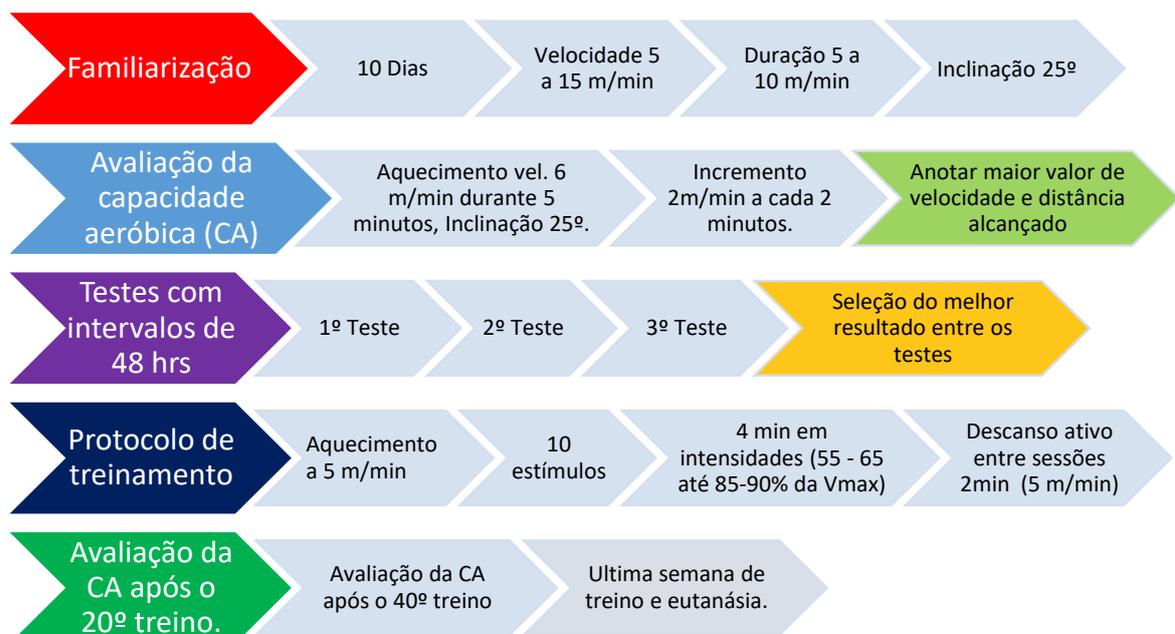


Figura 4. Fluxograma do delineamento experimental do estudo.

3.5 FORMAS DE ANÁLISE

Para realizar as comparações entre momentos e entre grupos, com o intuito de ajustar o indicador de desempenho para o peso corporal, calculou-se o trabalho total realizado (T) segundo a seguinte fórmula: $T = \text{peso corporal (kg)} \times \text{distância percorrida (m)} \times \text{inclinação da esteira (seno } 25^\circ)$ (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2010). No entanto, a distância foi considerada de duas formas distintas: aquela obtida pela média dos 3 testes na semana de avaliação (denominado de T.médio) e aquela obtida com a distância máxima atingida em qualquer um dos 3 testes em cada semana de avaliação (T.máximo).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade de cada variável dependente foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk e inspeção visual do Q-Q plot. Para comparar a progressão do volume de treinamento foi realizado teste de ANOVA one-way para medidas repetidas com post-hoc de Tukey. Para verificar o efeito do tempo no peso corporal e comparar a intensidade prescrita com base no %Vmax obtido na AV1 com a intensidade corrigida com base nas avaliações ao longo da intervenção foi utilizado o teste t pareado. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para verificar a associação entre peso e distância. A análise de variância (ANOVA 3 x 4) com post-hoc de Tukey foi usada para comparar as diferenças na distância percorrida entre os momentos "Avaliação 1", "Avaliação 2" e "Avaliação 3" e entre os quatro grupos Macho E, Macho C, Fêmea E, Fêmea C. Nos quatro grupos, em cada variável estudada, compararam-se as variações absolutas (Δ abs) e relativas ($\Delta\%$) no período inicial e final do estudo, por meio de uma ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

Foi utilizado o software Microsoft Excel ® 2016 versão 16.0 para tabulação dos dados e o software GraphPad Prism versão 7.0 para as análises descritivas e inferenciais, bem como para a confecção dos gráficos.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DO VOLUME E INTENSIDADE DO TREINAMENTO

Na figura 5 e tabela 2 são descritas as características do programa de treinamento (volume e intensidade) e a comparação pareada entre a intensidade prescrita a priori e corrigida a posteriori com os valores obtidos nas avaliações ao longo da intervenção. A intensidade descrita na tabela 2 é correspondente ao valor percentual obtido pela razão entre a velocidade do treino (carga imposta) e a maior velocidade máxima (Vmax) atingida entre os três testes realizados na AV1 (carga de referência). A intensidade corrigida, segue o mesmo princípio, exceto que utiliza a Vmax obtida mais recentemente, assim é definida como o valor percentual obtido pela razão entre a velocidade do treino e a Vmax da AV1 para as quatro semanas iniciais e Vmax da AV2 para as semanas 6-9) e AV3 para a semana 11, subsequente aos testes finais. Destaca-se que a numeração das semanas inclui as duas semanas utilizadas para a realização de AV1 e AV2.

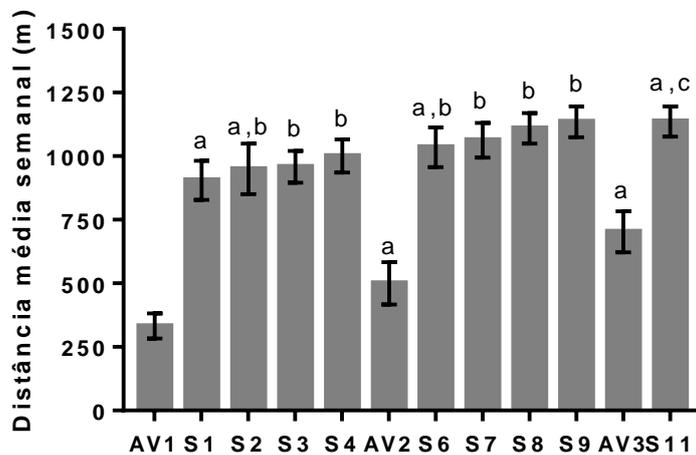


Figura 5. Distância média \pm DP percorrida semanalmente pelos grupos que realizaram protocolo de treinamento (para o cálculo da média semanal foram considerados os 5 dias úteis da semana).

S: semana de treinamento; a: diferença significativa na comparação com a semana de treinamento anterior; b: diferença significativa na comparação com duas semanas de treinamento anteriores; c: diferença significativa na comparação com três semanas de treinamento anteriores. ($p < 0,05$; ANOVA one-way medidas repetidas / Post-hoc de Tukey).

Tabela 2. Características do programa de treinamento e comparação pareada entre as intensidades.

Semanas	Volume (m)	Velocidade (m/min)	Intensidade (% Vmax no AV1)	Intensidade corrigida (% Vmax)	<i>p</i>
AV1					
1	905 ± 77,0	20.5 ± 1,6	61,9 ± 3,3	n.a	-
2	949,7 ± 99,1	21.9 ± 2,1	66,1 ± 3,4	n.a	-
3	958,3 ± 62,5	22.7 ± 1,8	68,4 ± 3,4	n.a	-
4	1000,8 ± 64,7	24.1 ± 1,7	72,5 ± 3,6	n.a	-
AV2					
6	1035,1 ± 78,2	24.8 ± 1,8	75,9 ± 3,6	62,3 ± 4,2 [#]	0,001
7	1062,5 ± 68,7	25.5 ± 1,7	77,8 ± 4,5	63,9 ± 4,5 [#]	0,001
8	1109,2 ± 59,8	26.9 ± 1,7	82,0 ± 4,7	67,3 ± 4,9 [#]	0,001
9	1135,4 ± 60,8	27.5 ± 1,6	83,7 ± 4,8	68,7 ± 5,0 [#]	0,001
AV3					
11	1136,5 ± 59,6	27.5 ± 1,6	83,7 ± 4,8	56,7 ± 3,8 [#]	0,001

n.a: não se aplica; # Teste t pareado

4.2 COMPARAÇÃO DOS TESTES NAS TRÊS AVALIAÇÕES

As figuras 6 e 7 apresentam os resultados dos três testes máximos sequenciais separados por 48 horas entre cada. Na análise de variância (ANOVA 3 x 4), foi encontrada diferença entre sexo na avaliação 1 ($p < 0,001$) e o post-hoc de Tukey mostrou diferença do teste 2 ($536,9 \pm 116,2$ m) com o teste 3 ($652,3 \pm 121,0$ m) no grupo de fêmeas exercício (Fêmea E) ($p < 0,05$). Na avaliação 2 houve diferença significativa entre sexo ($p < 0,001$), tempo ($p < 0,05$) e interação ($p < 0,05$). O post-hoc mostrou diferença entre o teste 1 ($753,2 \pm 163,0$ m) e teste 2 ($1002,2 \pm 105,3$ m) ($p < 0,001$) e entre o teste 3 ($991,1 \pm 132,9$ m) e teste 1 ($753,2 \pm 163,0$ m) ($p < 0,001$) no grupo de fêmeas exercício. Na avaliação 3 houve diferença significativa entre sexo ($p < 0,001$), tempo ($p < 0,001$). O post-hoc mostrou diferença entre o teste 1 ($482,2 \pm 80,6$ m) e teste 2 ($862,2 \pm 285,7$ m) ($p < 0,001$) e entre o teste 3 ($772,2 \pm 194,7$ m) e teste 1 ($482,2 \pm 80,6$ m) ($p < 0,05$) no grupo de machos controle (Macho C). Houve diferença entre o teste 1 ($973,0 \pm 109,1$ m) e teste 2 ($1260,6 \pm 109,7$ m) ($p < 0,01$) e entre o teste 3 ($1251,4 \pm 256,7$ m) e teste 1 ($973,0 \pm 109,1$ m) ($p < 0,01$) no grupo de machos exercício (Macho E). No grupo de fêmeas controle (Fêmea C) houve diferença entre o teste 1 ($407,8 \pm 95,0$ m) e teste 2 ($933,0 \pm 162,9$

m) ($p < 0,001$) e entre o teste 2 ($933,0 \pm 162,9$ m) e teste 3 ($570,4 \pm 161,2$ m) ($p < 0,01$). No grupo de fêmeas exercício houve diferença entre o teste 1 ($1040,9 \pm 191,0$ m) e teste 2 ($1328,9 \pm 160,1$ m) ($p < 0,001$). Os efeitos e interações que porventura não tenham sido mencionados não foram significativos ($p > 0,05$).

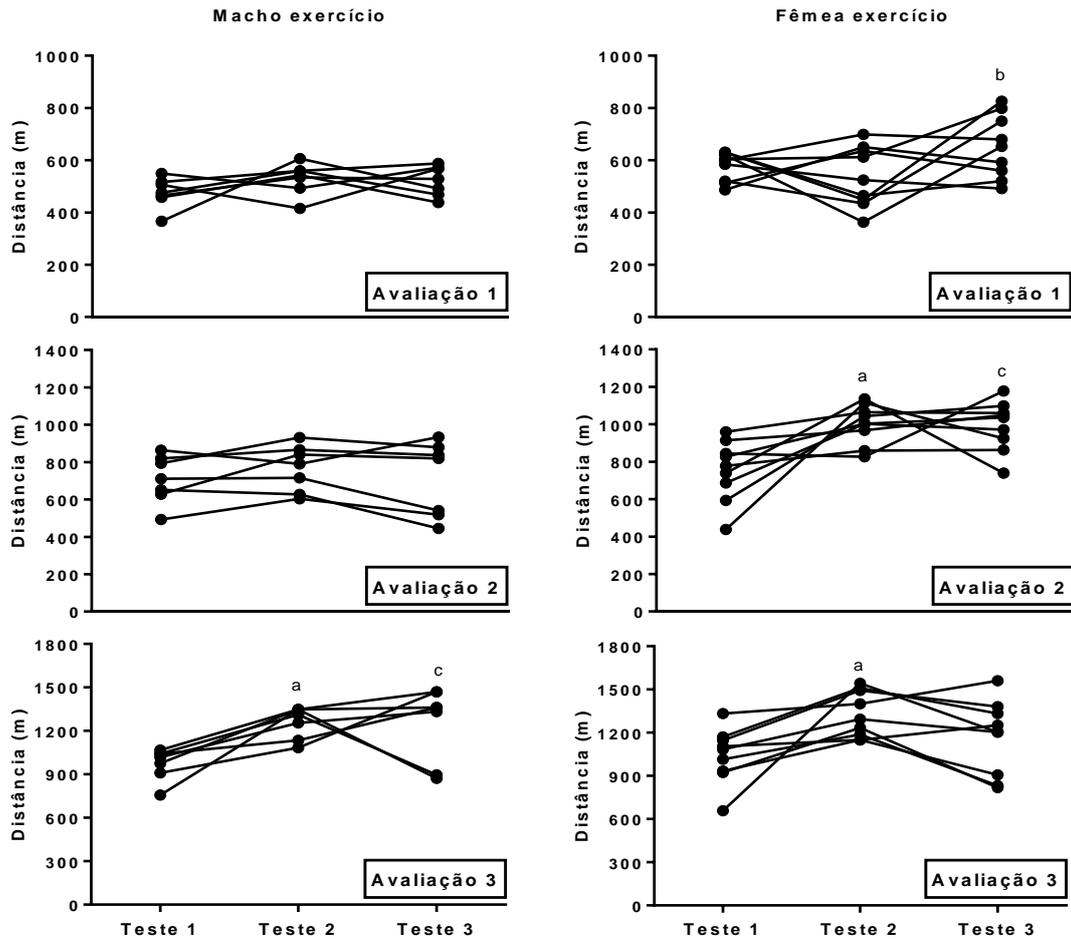


Figura 6. Comparação do desempenho físico dos grupos exercício entre os três testes realizados em cada uma das 3 avaliações do protocolo de treinamento físico.

a: diferença significativa entre o teste 2 e o teste 1; b: diferença significativa entre o teste 3 e o teste 2; c: diferença significativa entre o teste 3 e o teste 1. ($p < 0,05$; post hoc - Tukey).

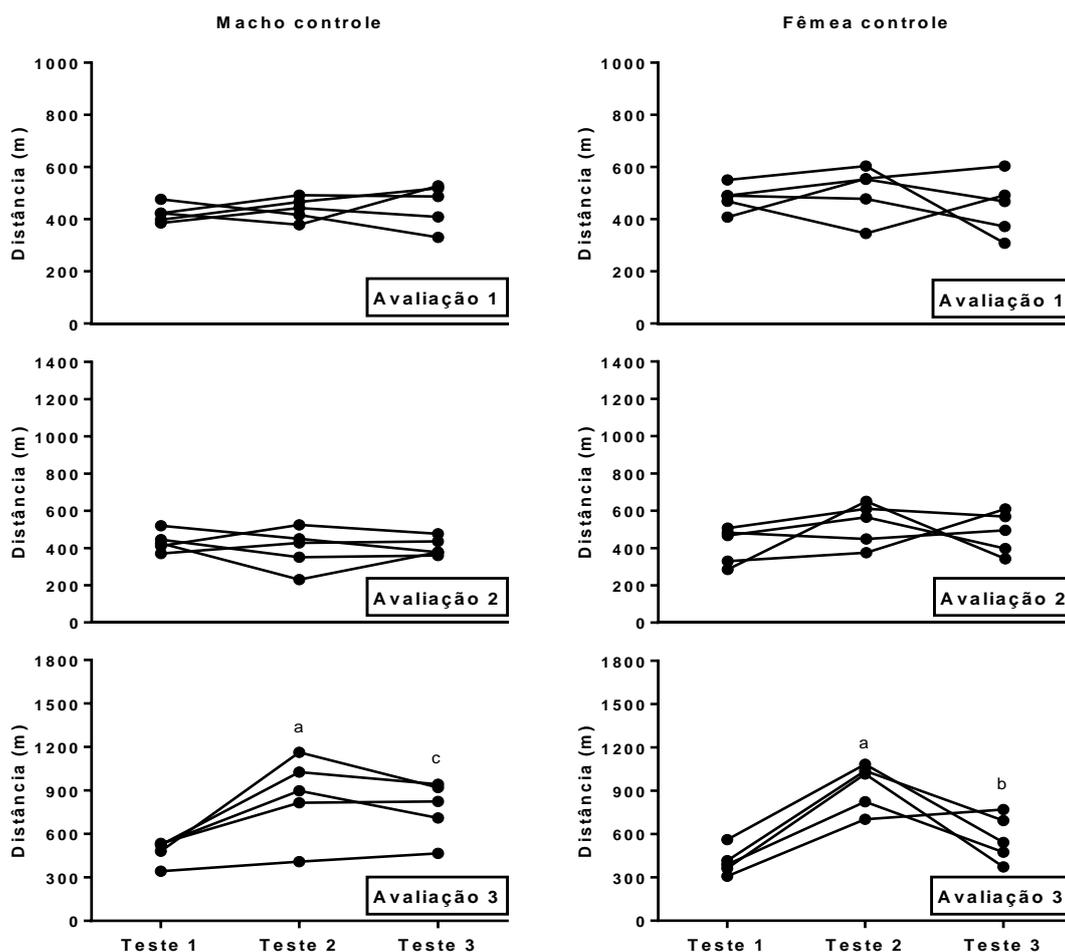


Figura 7. Comparação do desempenho físico dos grupos controle entre os três testes realizados em cada uma das 3 avaliações do protocolo de treinamento físico.

a: diferença significativa entre o teste 2 e o teste 1; b: diferença significativa entre o teste 3 e o teste 2; c: diferença significativa entre o teste 3 e o teste 1. ($p < 0,05$; post hoc - Tukey).

Verificando em qual dos 3 testes os animais atingiram a maior Vmax dentro de cada período de avaliação, observou-se que no grupo exercício na avaliação 1 houve um maior número de animais atingindo a Vmax no teste 2, sendo os percentuais de animais que atingiram a Vmax nos testes 1, 2 e 3 iguais a 30,9 %, 45,2 % e 23,8 %, respectivamente. Na avaliação 2 também houve um maior número de animais atingindo a Vmax no teste 2, sendo os percentuais de animais que atingiram a Vmax nos testes 1, 2 e 3 iguais a 14,3 %, 56,3 % e 29,7 %, respectivamente. Na avaliação 3, novamente foi visto um maior número de animais atingindo a Vmax no teste 2, sendo os percentuais de animais que atingiram a Vmax nos testes 1, 2 e 3 iguais a 0 %, 60,3 % e 39,7 %, respectivamente.

No grupo controle foi observado o mesmo fenômeno visto no grupo exercício. Nas três avaliações o teste 2 foi aquele onde a maioria dos animais atingiram seus melhores resultados. Na avaliação 1 os percentuais de animais que atingiram a V_{max} nos testes 1, 2 e 3 foram, respectivamente, 20 %, 50 % e 30 %. Na avaliação 2 esses percentuais foram de 40 %, 50 % e 10 %. Já na avaliação 3 encontramos os seguintes percentuais: 0 %, 70 % e 30 %.

Como forma de avaliação complementar para a se quantificar a variação da distância entre os testes em cada uma das 3 avaliações, calcularam-se as proporções de animais que apresentaram variação positiva, estabilidade ou variação negativa entre os três testes. Consideramos como positiva uma variação da distância percorrida relativa maior que 10% entre um teste e outro na mesma avaliação; negativa uma variação menor que 10% e como desempenho estável os casos que variaram menos que 10%, em qualquer direção. Os resultados dessa análise são apresentados nas tabela 3 e 4. Observa-se que, em média, do segundo teste para o primeiro, quase 85% dos animais variaram mais que 10%, sendo a maioria com variação positiva. Entre o teste 3 e o teste 2 ocorreu o maior percentual de estabilidade de desempenho (38,5%), mas ainda assim esse comportamento ocorreu em menos da metade dos animais. Entre os teste 3 e 1, observou-se comportamento semelhante à variação do teste 2 para o teste 1.

Tabela 3. Proporção das variações da distância relativa entre os testes, em cada uma das três avaliações.

Grupos	Variação	Avaliação 1			Avaliação 2			Avaliação 3		
		$\Delta\%T1-T2$	$\Delta\%T2-T3$	$\Delta\%T1-T3$	$\Delta\%T1-T2$	$\Delta\%T2-T3$	$\Delta\%T1-T3$	$\Delta\%T1-T2$	$\Delta\%T2-T3$	$\Delta\%T1-T3$
Macho C n= 5	>10%	60	40	60	40	20	40	100	20	100
	<10% ou > -10%	0	40	20	0	60	0	0	40	0
	< -10%	40	20	20	60	20	60	0	40	0
Macho E n= 7	>10%	57	29	57	43	14	29	86	29	86
	<10% ou > -10%	14	29	43	57	43	43	14	43	0
	< -10%	29	43	0	0	43	29	0	29	14
Fêmea C n= 5	>10%	40	20	20	80	40	60	100	0	60
	<10% ou > -10%	20	20	40	20	20	20	0	20	40
	< -10%	40	60	40	0	40	20	0	80	0
Fêmea E n= 9	>10%	33	56	56	78	11	89	78	11	67
	<10% ou > -10%	11	33	22	22	67	11	22	33	11
	< -10%	56	11	22	0	22	0	0	56	22
Geral n= 26	>10%	46	38	50	62	19	58	88	15	77
	<10% ou > -10%	12	31	31	27	50	19	12	35	12
	< -10%	42	31	19	12	31	23	0	50	12

Tabela 4. Proporções médias das variação média da distância relativa no conjunto das três avaliações.

Grupos	Variação	Variação média das 3 avaliações		
		$\Delta\%$ T1 - T2	$\Delta\%$ T2 - T3	$\Delta\%$ T1 - T3
Macho C n= 5	>10%	66.7	26.7	66.7
	<10% ou > -10%	0.0	46.7	6.7
	< -10%	33.3	26.7	26.7
Macho E n= 7	>10%	61.9	23.8	57.1
	<10% ou > -10%	28.6	38.1	28.6
	< -10%	9.5	38.1	14.3
Fêmea C n= 5	>10%	73.3	20.0	46.7
	<10% ou > -10%	13.3	20.0	33.3
	< -10%	13.3	60.0	20.0
Fêmea E n= 9	>10%	63.0	25.9	70.4
	<10% ou > -10%	18.5	44.4	14.8
	< -10%	18.5	29.6	14.8
Geral n= 26	>10%	65.4	24.4	61.5
	<10% ou > -10%	16.7	38.5	20.5
	< -10%	17.9	37.2	17.9
Totais		100%	100%	100%

4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO

Ao analisar as correlações entre peso e distância média nos 3 testes e distância máxima entre os 3 testes, em cada semana de avaliação, foram encontradas correlações inversamente proporcionais significativas. A correlação entre o peso e distância média percorrida na AV1 foi ($r = -0,46$; $p < 0,01$), sendo que com a distância máxima a correlação foi de $r = -0,51$ ($p < 0,01$). Na AV2 esses valores de correlação foram de $r = -0,52$ ($p < 0,01$) e $r = -0,60$ ($p < 0,01$). Já em AV3 as correlações não foram significativas: $r = -0,20$ ($p = 0,32$) e $r = -0,22$ ($p = 0,29$). Para realizar as comparações entre momentos e entre grupos, com o intuito de ajustar o indicador de

desempenho para o peso corporal, calculou-se o trabalho total realizado (T) com a distância média dos 3 testes e com a distância máxima atingida em qualquer um dos 3 testes em cada semana de avaliação.

Na figura 8 são apresentados os resultados do efeito do treinamento intervalado entre momentos e entre grupos mensurados através de diferentes medidas de desempenho: o trabalho médio obtido nos 3 testes na semana de avaliação (T.médio) e o trabalho máximo entre os 3 testes mesurado na semana de avaliação (T.máximo). Na análise de variância foram encontradas diferenças significativas semelhantes em ambas as medidas de desempenho. Houve diferença significativa entre grupo ($p<0,001$), tempo ($p<0,001$) e interação ($p<0,001$) tanto para os valores de T.médio quanto para os valores de T.máximo.

Nas comparações entre momentos utilizando o T.médio, no grupo Macho C houve diferença significativa entre AV2 ($5,042 \pm 0,493 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV3 ($8,980 \pm 2,414 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,001$) e entre AV3 ($8,980 \pm 2,414 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV1 ($4,859 \pm 0,371 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,001$). No grupo Macho E houve um aumento significativo ($p<0,001$) em todos os momentos, AV1 ($5,527 \pm 0,483 \text{ kg}^*\text{m}$) < AV2 ($8,162 \pm 1,375 \text{ kg}^*\text{m}$) < AV3 ($13,521 \pm 2,000 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV1 ($5,527 \pm 0,483 \text{ kg}^*\text{m}$) < AV3 ($13,521 \pm 2,000 \text{ kg}^*\text{m}$). No grupo de Fêmea C houve diferença significativa entre AV2 ($4,573 \pm 0,466 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV3 ($6,479 \pm 0,820 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,05$) e entre AV1 ($4,183 \pm 0,433 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV3 ($6,479 \pm 0,820 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,01$). No grupo de Fêmea E assim como no grupo Macho E houve um aumento significativo ($p<0,001$) em todos os momentos AV1 ($5,311 \pm 0,455 \text{ kg}^*\text{m}$) < AV2 ($8,630 \pm 0,859 \text{ kg}^*\text{m}$) < AV3 ($12,222 \pm 1,785 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV1 ($5,311 \pm 0,455 \text{ kg}^*\text{m}$) < AV3 ($12,222 \pm 1,785 \text{ kg}^*\text{m}$).

Na comparação entre momentos utilizando o T.máximo, no grupo Macho C houve diferença significativa entre AV2 ($5,749 \pm 0,269 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV3 ($11,111 \pm 3,300 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,001$) e entre AV1 ($5,459 \pm 0,557 \text{ m/g}$) e AV3 ($11,111 \pm 3,300 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,001$). No grupo Macho E houve um aumento significativo em todos os momentos, AV1 ($6,147 \pm 0,431 \text{ kg}^*\text{m}$) < AV2 ($8,878 \pm 1,362 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,01$) e AV3 ($16,051 \pm 2,146 \text{ kg}^*\text{m}$) > AV2 ($8,878 \pm 1,362 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,001$). No grupo Fêmea C houve diferença significativa entre AV2 ($5,634 \pm 0,519 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV3 ($9,667 \pm 1,727 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,001$) e entre AV1 ($4,789 \pm 0,573 \text{ kg}^*\text{m}$) e AV3 ($9,667 \pm 1,727 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p<0,001$). No grupo Fêmea E assim como no grupo Macho E houve um

aumento significativo ($p < 0,001$) em todos os momentos AV1 ($6,235 \pm 0,656 \text{ kg}\cdot\text{m}$) < AV2 ($9,984 \pm 1,032 \text{ kg}\cdot\text{m}$) < AV3 ($13,553 \pm 1,771 \text{ kg}\cdot\text{m}$).

Na comparação entre grupos do mesmo sexo utilizando o T.médio, houve diferença entre Macho C e Macho E na AV2 ($14,3 \pm 6,8$; $27,7 \pm 6,8 \text{ m/g}$) ($p < 0,001$) e AV3 ($23,6 \pm 4,5$; $42,5 \pm 4,5 \text{ m/g}$) ($p < 0,001$) respectivamente. O mesmo fenômeno ocorreu entre Fêmea C e Fêmea E na AV2 ($21,0 \pm 3,2$; $41,2 \pm 3,5 \text{ m/g}$) ($p < 0,001$) e AV3 ($26,6 \pm 4,0$; $51,8 \pm 6,9 \text{ m/g}$) ($p < 0,001$) respectivamente. Na mesma comparação porém utilizando o T.máximo, os resultados se repetem, existem diferenças entre Macho C e Macho E na AV2 ($16,4 \pm 6,7$; $30,0 \pm 6,7 \text{ m/g}$) ($p < 0,001$) e AV3 ($29,4 \pm 3,5$; $50,4 \pm 3,5 \text{ m/g}$) ($p < 0,001$) respectivamente. Com o mesmo ocorrendo entre Fêmea C e Fêmea E na AV2 ($25,9 \pm 3,9$; $47,8 \pm 5,2 \text{ m/g}$) ($p < 0,001$) e AV3 ($39,3 \pm 5,7$; $57,6 \pm 7,7 \text{ m/g}$) respectivamente ($p < 0,001$).

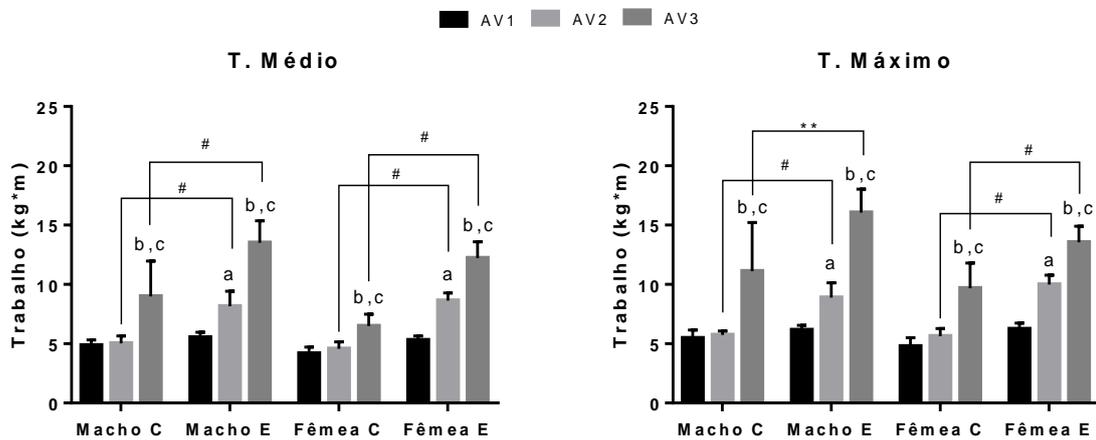


Figura 8. Comparação do efeito do treinamento entre momentos e entre grupos do mesmo sexo (média e IC 95%).

a: diferença significativa entre AV1 e AV2. b: diferença significativa entre AV2 e AV3. c: diferença significativa entre AV3 e AV1. ($p < 0,05$; post hoc - Tukey). **: diferença significativa entre grupos do mesmo sexo ($p < 0,001$). #: diferença significativa entre grupos do mesmo sexo ($p < 0,001$). (post hoc - Tukey).

Na figura 9 são apresentados os resultados da comparação entre sexo nos grupos exercício e controle em diferentes momentos. Utilizando o T.máximo para comparação, foi encontrado diferença somente na AV3 entre Macho E ($16,051 \pm 2,146 \text{ kg}^*\text{m}$) e Fêmea E ($13,553 \pm 1,771 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p < 0,01$). Utilizando o T.médio, também foi encontrado diferença significativa na AV3 entre Macho C ($8,980 \pm 2,414 \text{ kg}^*\text{m}$) e Fêmea C ($6,479 \pm 0,820 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p < 0,05$).

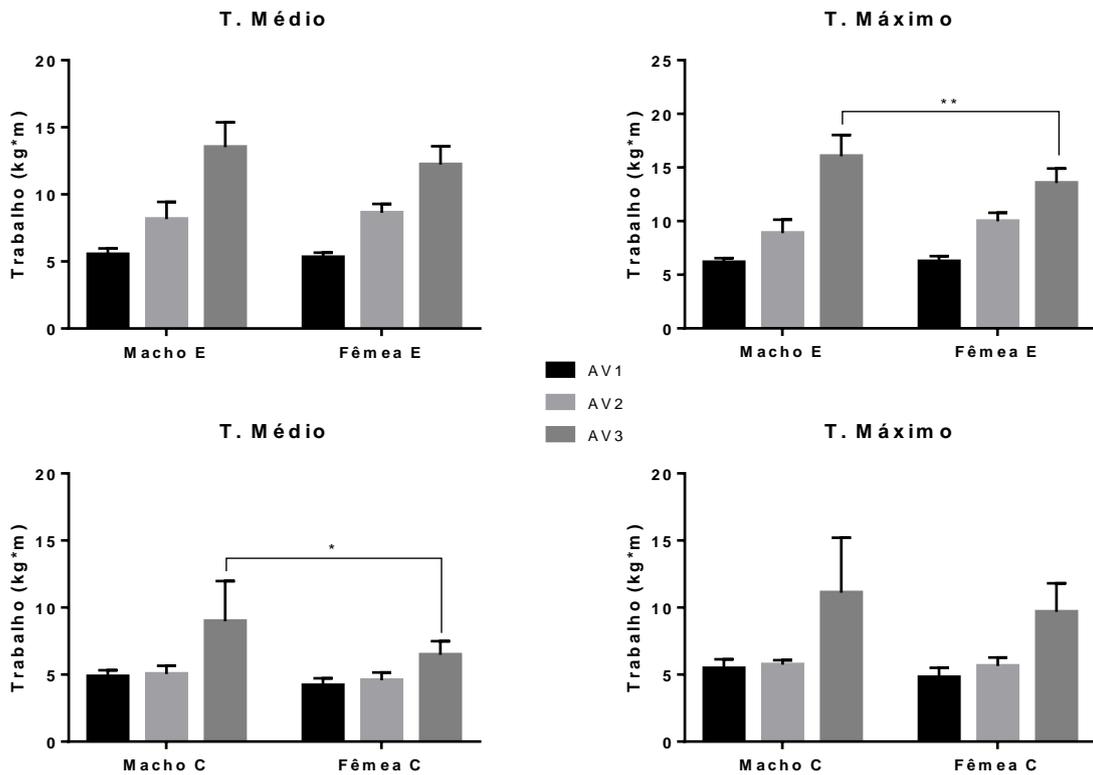


Figura 9. Comparação do efeito do treinamento entre sexo (média e IC 95%).

*: diferença significativa ($p < 0,05$), **: diferença significativa ($p < 0,01$) e #: diferença significativa ($p < 0,001$). ($p < 0,05$; post hoc - Tukey).

Na figura 10 são apresentados os resultados referentes ao efeito da intervenção entre grupos através da diferença absoluta e relativa dos valores pré e pós utilizando como medida de desempenho tanto o T.médio quanto o T.máximo. A ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey mostrou as respectivas diferenças significativas na comparação diferença

absoluta (Δ abs) usando o T.médio comparando o grupo Macho E ($7,994 \pm 1,600 \text{ kg}^*\text{m}$) com Macho C ($4,121 \pm 2,269 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p < 0,01$) e Fêmea E ($6,911 \pm 1,676 \text{ kg}^*\text{m}$) com Fêmea C ($2,296 \pm 0,618 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p < 0,001$). Quando utilizado a diferença relativa ($\Delta\%$), houve diferença quando comparado grupo Macho E ($143,9 \pm 20,7 \%$) com Macho C ($84,4 \pm 46,3 \%$) ($p < 0,05$) e Fêmea E ($130,8 \pm 32,8\%$) com Fêmea C ($55,1 \pm 14,1 \%$) ($p < 0,01$).

Quando utilizamos para essa comparação os valores da diferença absoluta e relativa usando o T.máximo, algumas comparações que foram significativas na análise anterior perdem significância. Somente foi encontrada diferença significativa na comparação da diferença absoluta do grupo Macho E ($9,904 \pm 1,883 \text{ kg}^*\text{m}$) com Macho C ($5,653 \pm 3,188 \text{ kg}^*\text{m}$) ($p < 0,05$). Quando utilizado a diferença relativa ($\Delta\%$), houve diferença porém não considerada significativa quando comparamos o grupo Macho E ($160,8 \pm 25,1 \%$) com Macho C ($104,1 \pm 61,3 \%$) ($p = 0,08$).

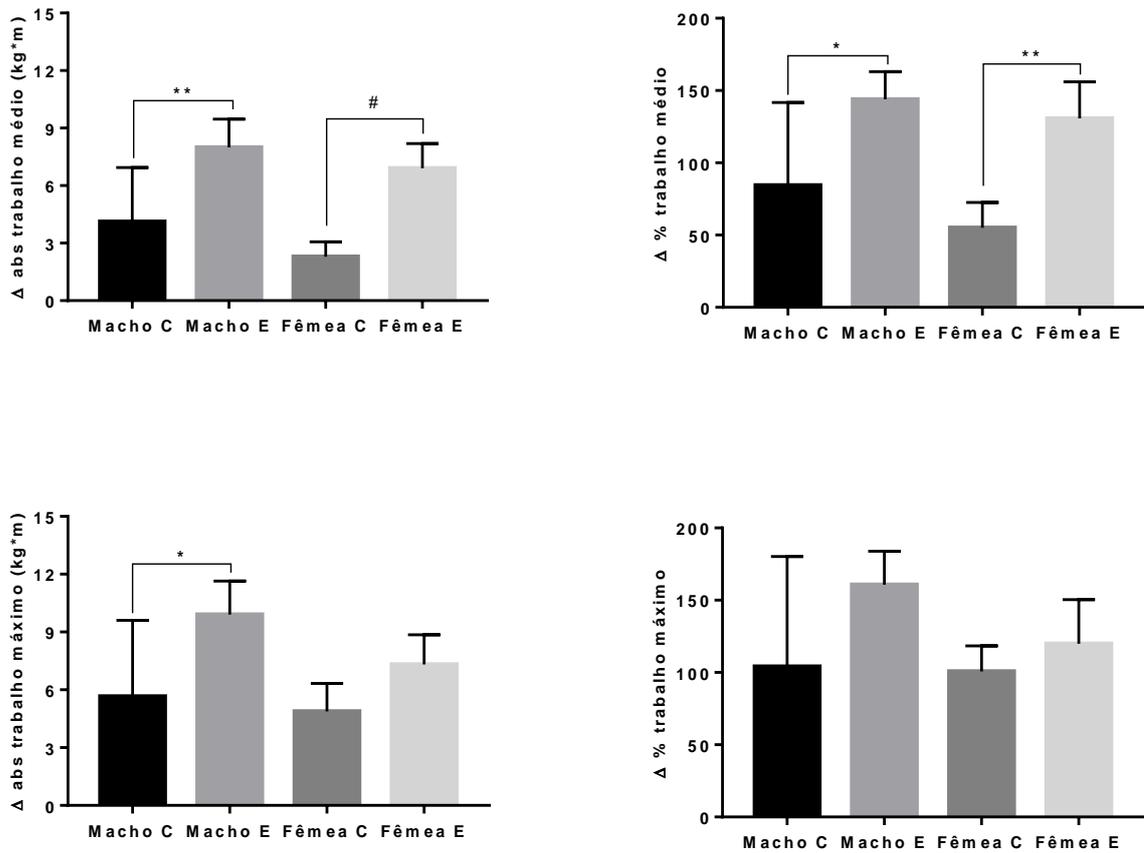


Figura 10. Comparação do efeito do treinamento entre grupos em de diferentes medidas de desempenho através da diferença absoluta e relativa dos valores pré e pós (média e IC 95%).

*: diferença significativa ($p < 0,05$), **: diferença significativa ($p < 0,01$) e #: diferença significativa ($p < 0,001$) na comparação com o grupo controle. ($p < 0,05$; post hoc - Tukey).

5. DISCUSSÃO

Esse trabalho buscou avaliar a variação entre os testes de capacidade aeróbica durante as semanas de avaliação, o efeito do treinamento intervalado entre momentos e entre grupos, por meio do cálculo do trabalho usando a média dos três testes realizados em cada avaliação (T.médio) e o valor máximo da distância aferida entre os três testes em cada avaliação (T.máximo) e comparando as diferenças absoluta e relativa dos valores pré- e pós-treinamento, além de comparar a progressão do incremento de volume e intensidade ao longo da intervenção. Nesse contexto de abordagem metodológica sobre experimentos animais com camundongos tendo por alvo principal os efeitos de treinamento físico em diferentes aspectos anatomo-fisiológicos, os principais achados foram: 1) houve significativas variações de rendimento entre os 3 testes em cada momento de avaliação; 2) o teste 2 foi aquele que apresentou maior ocorrência de desempenho máximo; 3) os animais dos grupos exercício melhoraram significativamente seu desempenho físico máximo, apesar de efetivamente treinarem em intensidades muito inferiores às aquelas originalmente planejadas e comumente referidas na literatura; 4) em valores absolutos, uso do trabalho máximo ou do trabalho médio como métrica de avaliação resultou em interpretações semelhantes e 5) em análises das diferenças, tanto as absolutas quanto as relativas, as variações se mostraram mais sensíveis quando calculadas a partir do trabalho médio.

Na análise das comparações estatísticas entre os três testes realizados durante as semanas de avaliação, foi visto que em todas as avaliações os animais do grupo Fêmea E aumentaram o desempenho quando comparado os valores do primeiro teste com os testes subsequentes. No entanto, os grupos de Macho E, Macho C e Fêmea C apresentaram desempenho mais homogêneo entre os testes nas duas primeiras avaliações e apresentando uma variação significativa somente na AV3, corroborando achados preliminares anteriormente demonstrado por nosso grupo (BARRETO *et al.*, 2020).

Quando verificamos em qual dos 3 testes os animais atingiram a maior Vmax dentro de cada período de avaliação, foi visto que em todas as avaliações um maior percentual de animais ($55,3 \pm 9,0\%$) atingiu a Vmax no teste 2. Ao verificar a variação da distância relativa entre os testes em cada avaliação e a média das três avaliações (tabelas 3 e 4), foi visto que, em média,

65.4% dos animais aumentaram seus desempenhos em valores >10% do primeiro para o segundo teste e na variação do primeiro para o terceiro teste, 61,5% dos animais aumentaram seus desempenhos em valores >10%. Esses achados são de grande importância no campo da prescrição e avaliação do treinamento, por demonstrar que há necessidade de protocolos rigorosos com mais de um teste de esforço para determinar os valores máximos de capacidade física máxima antes de intervenções, diminuindo chances de erros de interpretação e garantindo uma medida mais apropriada, com maior precisão para prescrição da carga de treinamento. Na prática, os dados apontam para uma significativa tendência de superestimação de efeitos do treinamento caso apenas um teste tivesse sido realizado, uma vez que parte do incremento de desempenho seria de fato decorrente da subestimação inicial do desempenho máximo (CARU *et al.*, 2019; CHAVANELLE *et al.*, 2017). É importante destacar que apesar muitas comparações dentro de cada grupo terem demonstrado estabilidade estatística de desempenho entre os testes, especialmente em AV1 e AV2 e de forma mais pronunciada nos grupos controle, na média se observou que em aproximadamente 65% dos casos houve incremento superior a 10% entre os testes 2 comparativamente aos testes 1. Ainda, na média, em 24% dos casos os animais aumentaram mais de 10% de rendimento entre os testes 3 e os testes 2. Em um cenário ideal do ponto de vista metodológico, a quantidade de testes necessária deveria ser definida quando se alcançasse estabilidade de rendimento de um teste comparativamente ao anterior. Entretanto, se estabeleceu como limite o número de 3 testes admitindo-se a hipótese, bastante plausível, de que após 3 dias consecutivos de testes com estímulos máximos, ainda que intercalados por 48h de repouso, os testes subsequentes incorporariam possíveis efeitos de treinamento, perdendo-se assim a característica de teste de referência.

Ao avaliar o efeito do treinamento intervalado entre momentos e entre grupos usando os valores de T.médio e T.máximo, foi visto que os grupos que realizaram exercício (Macho E e Fêmea E) foram significativamente diferentes ao comparar os valores de ambas as medidas de trabalho entre AV1 e AV2, AV2 e AV3 e AV3 e AV1. Além disso, os grupos Macho E e Fêmea E também foram significativamente diferentes de seus controles (Macho C e Fêmea C) a partir da segunda avaliação e se mantiveram diferentes na terceira avaliação (figura 8). Nesse sentido, os achados demonstram que o sistema de treinamento realizado, a despeito dos ajustes

de carga instituídos (comentários à frente), foi efetivo para gerar ganho significativo de desempenho, independentemente da métrica utilizada, se trabalho máximo ou trabalho médio.

Ao comparar as diferenças absolutas e relativas dos valores pré (AV1) e pós (AV3) de T.médio e T.máximo, vimos que, os grupos Macho E e Fêmea E apresentaram um incremento do T.médio absoluto e relativo significativamente maior em comparação com os grupos controle (Macho C e Fêmea C). Na análise utilizando o T.máximo, a única diferença observada é o maior aumento na diferença absoluta do grupo Macho E em comparação com o grupo Macho C. Esses achados indicam que, talvez a melhor maneira de avaliar o desempenho dos animais seja através da medida do T.médio ao invés do T.máximo. Uma média da medida em triplicata pode aumentar o poder estatístico corrigindo possíveis erros sistemáticos inerentes a natureza do estilo de corrida dos animais, do tipo “para e vai” (POOLE *et al.*, 2020), e aos meios de avaliação.

O desempenho na realização de exercícios em esteira pode variar de acordo com a linhagens camundongo (POOLE *et al.*, 2020). No entanto, parece não existir diferença no desempenho na comparação entre sexo (AYACHI *et al.*, 2016; BILLAT, V. L. *et al.*, 2005; POOLE *et al.*, 2020). Por outro lado, na intervenção com rodas de correr, camundongos fêmeas tendem a correr mais e mais longe por noite do que seus homólogos machos (KONHILAS *et al.*, 2004). A questão da influência do sexo no treinamento físico em modelos animais com camundongos é necessária e importante, porém vai além do escopo deste trabalho.

Em relação ao programa de treinamento dos animais (figura 5 e tabela 2), a progressão na intensidade em resposta a adaptação dos animais baseada na avaliação da resposta ao treinamento com uso da escala *Likert* de 4 pontos e o respectivo incremento de 1 m/min na velocidade desempenhada durante o momento de *esforço*, mostrou ser eficiente em aumentar o volume total de treino ao longo das semanas (figura 5). Em outras palavras, o programa, como instituído, se comprovou eficiente em promover as adaptações esperadas com o treinamento físico, podendo, portanto, ser considerado eficiente. Durante a fase de estudo piloto, realizado com mesmo método de treinamento, com o mesmo modelo animal, porém sem o uso da avaliação da tolerância ao esforço pela escala *Likert*, havíamos definido a carga de trabalho com intensidades na faixa de 85-90% da V_{max} conforme publicado em estudo anteriores (CHAVANELLE *et al.*, 2017; KEMI *et al.*, 2002; TOTI *et al.*, 2013). Entretanto, observamos

que os animais não conseguiam realizar a tarefa, mesmo sob forte estimulação mecânica. Na prática, as intensidades descritas na literatura não se mostraram possíveis de serem realizadas, tanto para o grupo macho quanto para o grupo fêmea. Foram então implementados ajustes de modo a se conseguir com que os animais efetivamente realizassem as sessões de treinamento físico de modo intervalado no sistema 4:2. Isso só foi alcançado com reduções progressivas da intensidade a valores próximos à 60% da V_{max} , com o ajuste do primeiro dos 4 minutos do momento de corrida e a inclusão da escala *Likert* de avaliação da tolerância ao esforço (dados não publicados). Tornar o primeiro minuto da corrida como minuto de aceleração gradual até a velocidade predeterminada para a sessão fez com que os animais conseguissem responder de maneira natural a intensidade imposta sem necessitar de estímulos externos para a realização do treinamento. Essa medida foi necessária pois o incremento súbito de velocidade na passagem da fase de recuperação ativa para a fase de corrida fazia com que os animais desistissem da carga imposta e tentassem maneiras alternativas de “evitar” o exercício (segurar nas laterais das baias e subir nos rolos de papel), reduzindo assim a distância total percorrida e, conseqüentemente, introduzindo uma variação intraindividual no volume total percorrido. Esta fase piloto se mostrou portanto crítica para o desenvolvimento da pesquisa e constitui importante achado, uma vez que o comportamento dos animais aqui estudados frente às cargas de treinamento intervalado foi absolutamente diferente daquilo que se observa descrito na literatura.

Assim, após os ajustes definidos a partir do estudo piloto, optamos por iniciar o treinamento na faixa de intensidade de 55-65%, a qual também se mostra adequada por se encontrar na zona da máxima fase estável do lactato em camundongos C57BL/6J (FERREIRA *et al.*, 2007). Planejava-se assim alcançar valores de intensidade na faixa de 85-90% da V_{max} de forma progressiva até a quarta semana de treinamento, quando seriam feitos novos testes para ajustes na intensidade após a segunda avaliação e continuar a progressão das cargas até o fim do experimento conforme visto no estudo de Wang *et al.*, (2017). No entanto, o que se observou novamente foi que ao realizar incrementos de velocidade superiores a 1 m/min ainda na primeira semana de treinamento, os animais apresentavam uma queda acentuada no desempenho da tarefa, o que nos forçou a reduzir a magnitude do incremento ou retornar para a intensidade anterior. Somente na semana 9, a qual antecedeu a última avaliação (AV3), os

animais alcançaram uma intensidade equivalente a $83,7 \pm 4,8\%$ da V_{max} obtidas na AV1. Por outro lado, adotando-se como referência os valores obtidos na segunda avaliação, planejada exatamente para revisão da carga, vimos que esse valor estava superestimado em uma média de 15% e que o valor de intensidade tendo como referência a V_{max} obtida na AV2, era de $68,7 \pm 5,0\%$. Ou seja, a carga real, após as adaptações ao treinamento das 4 semanas iniciais, era novamente em torno de 65%. Esses achados em conjunto demonstram que os animais não suportaram e não realizaram esforços superiores a uma intensidade relativa de 70% da V_{max} , não corroborando com os valores de intensidade demonstrados em estudos anteriores que empregaram método semelhante de treinamento intervalado (CHAVANELLE *et al.*, 2017; KEMI *et al.*, 2002; MILESKI, 2018; TOTI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

5.1 LIMITAÇÕES

Sabe-se que os camundongos são animais noturnos e que o fato de ter realizado o experimento no período diurno pode resultar em aumento nos níveis de estresse dos animais (JONES, 2007; POOLE *et al.*, 2020), sendo esse um viés confundidor que não foi controlado. Porém, sempre realizamos os protocolos do experimento durante o período matutino, que é um dos períodos mais próximos da fase escura do dia. Também deve ser levado em consideração que ao longo do tempo os animais tendem a se acostumar com a rotina imposta de inversão do ciclo claro-escuro característico da espécie. O método de avaliação da capacidade física máxima utilizado foi um método indireto sem o uso de medidas metabólicas, o que deixa o estudo sujeito a viés de aferição pois os camundongos exibem um padrão de corrida “para e vai”, o que aumenta com o tempo de esforço. Esse padrão de corrida “para e vai” pode inflar artificialmente o tempo, distância e velocidade máxima atingida no teste de esforço (POOLE *et al.*, 2020), além disso, por mais que exista uma forte correlação entre a velocidade de corrida na esteira e o VO_2 máx desde intensidades submáximas até níveis máximos (HØYDAL *et al.*, 2007), essa relação tende a diminuir ao longo do treinamento, devido à melhoria da economia de trabalho com menor consumo de oxigênio em velocidades submáximas de corrida (HØYDAL *et al.*, 2007). Este fenômeno pode introduzir um viés na comparação do grupo exercício com o grupo controle, apesar de todos fazerem todos os testes de forma padronizada.

Por mais que essas limitações possam influenciar nossos resultados, nosso estudo apresenta aspectos metodológicos relevantes que minimizam algumas dessas limitações, com destaque para: 1) a utilização da medida em triplicata da capacidade máxima de esforço; 2) o uso de escala qualitativa de resposta ao esforço (tipo Likert) para a definição do momento de aumento de carga; 3) a implementação de avaliação física intermediária para ajuste de carga de trabalho em relação aos prováveis efeitos progressivos do treinamento físico; e 4) a utilização de estímulos mecânicos e não o tradicional estímulo elétrico, como estímulo para continuação do esforço, reduzindo-se assim as chances de potencialização do estresse dos animais.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram que existe variação significativa entre os valores de distância do primeiro teste com os testes subsequentes, indicando assim a necessidade de se realizar mais de um teste de esforço para determinar os valores de V_{max} e, conseqüentemente, a capacidade aeróbica máxima em avaliações destinadas tanto para a definição de carga de trabalho quanto para as análises dos efeitos do treinamento físico. Os achados assim suportam a recomendação de que, para se determinar os valores de desempenho máximo para prescrição do treinamento, seja utilizado o maior valor atingido entre os três testes consecutivos. Por outro lado, para se avaliar o efeito do treinamento, os dados suportam a recomendação de que seja utilizado que no cálculo do trabalho a distância média atingida nos três ao invés da máxima. Concluímos também que, o treinamento intervalado foi capaz de aumentar capacidade física mensurada através de ambas as medidas de trabalho (máxima ou média). Sugere-se também, para um melhor controle do efeito de ganhos de rendimento associados ao treinamento, seja realizada avaliação intermediária, no caso de protocolos de 8 semanas. Por consequência, protocolos mais longos, de 12 ou 16 semanas por exemplo, provavelmente se beneficiariam de reavaliações periódicas a cada 4 semanas. Conclui-se também que percentuais de carga de trabalho de treinamento acima de 70% da velocidade máxima de desempenho em camundongos, aferida em 3 testes consecutivos com intervalo de 48 horas, não parecem ser viáveis para garantir a adequada realização do treinamento por parte dos animais e, conseqüentemente, suportar quaisquer conclusões que sejam dependentes dos efeitos de ganho de rendimento em decorrência do treinamento físico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYACHI, Mohamed *et al.* Validation of a Ramp Running Protocol for Determination of the True VO₂max in Mice. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00372>. Acesso em: 28 abr. 2021.

BARBOSA, Lívea Fujita; MEDEIROS, Marisa H. G. de; AUGUSTO, Ohara. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352–1360, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600034>

BARRETO, Kevin *et al.* Methodological aspects of the treadmill-assessed maximum aerobic capacity test in mice. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 29, n. Suplemento Especial, p. 118, 2020.

BILLAT, L. Véronique. Interval Training for Performance: A Scientific and Empirical Practice. **Sports Medicine**, v. 31, n. 1, p. 13–31, 2001a. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00007256-200131010-00002>

BILLAT, L. Véronique. Interval Training for Performance: A Scientific and Empirical Practice. **Sports Medicine**, v. 31, n. 2, p. 75–90, 2001b. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00007256-200131020-00001>

BILLAT, Veronique L. *et al.* Inter- and intrastrain variation in mouse critical running speed. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1258–1263, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00991.2004>

BUCHHEIT, Martin; LAURSEN, Paul B. High-Intensity Interval Training, Solutions to the Programming Puzzle. **Sports Medicine**, v. 43, n. 5, p. 313–338, 2013a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0029-x>

BUCHHEIT, Martin; LAURSEN, Paul B. High-Intensity Interval Training, Solutions to the Programming Puzzle. **Sports Medicine**, v. 43, n. 10, p. 927–954, 2013b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0066-5>

CARU, Maxime *et al.* Ethical consideration and feasibility demonstration of high-intensity interval training without the use of electrical shocks in mice with and without doxorubicin exposition. **American Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 2813–2820, 2019.

CHAVANELLE, Vivien *et al.* Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 204, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00276-8>

CHINWALLA, Asif T. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 520–562, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature01262>

FENG, Rui *et al.* A systematic comparison of exercise training protocols on animal models of cardiovascular capacity. **Life Sciences**, v. 217, p. 128–140, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.001>

FERREIRA, Julio CB *et al.* Maximal Lactate Steady State In Running Mice: Effect Of Exercise Training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x>

HARA, Hajime *et al.* Running endurance abnormality in mdx mice. **Muscle & Nerve**, v. 25, n. 2, p. 207–211, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mus.10023>

HARRISON, B. C. *et al.* Skeletal muscle adaptations in response to voluntary wheel running in myosin heavy chain null mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 1, p. 313–322, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00832.2001>

HØYDAL, Morten A. *et al.* Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 14, n. 6, p. 753–760, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e3281eacef1>

JONES, James H. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 6, p. 583–583, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.6.583>

KEMI, Ole Johan *et al.* Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, p. 1301–1309, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00231.2002>

KONHILAS, John P. *et al.* Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 6, p. H2768–H2776, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00292.2004>

LØNBRO, Simon *et al.* Reliability of blood lactate as a measure of exercise intensity in different strains of mice during forced treadmill running. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0215584, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215584>

MACHADO, Fabiana A. *et al.* Incremental test design, peak ‘aerobic’ running speed and endurance performance in runners. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 16, n. 6, p. 577–582, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.12.009>

MANN, Theresa; LAMBERTS, Robert Patrick; LAMBERT, Michael Ian. Methods of prescribing relative exercise intensity: physiological and practical considerations. **Sports**

medicine, v. 43, n. 7, p. 613–625, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0045-x>

MCARDLE, William D; KATCH, Frank I; KATCH, Victor L. **Exercise physiology: nutrition, energy, and human performance**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

MILANOVIĆ, Zoran; SPORIŠ, Goran; WESTON, Matthew. Effectiveness of High-Intensity Interval Training (HIT) and Continuous Endurance Training for VO₂max Improvements: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 45, n. 10, p. 1469–1481, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0365-0>

MILESKI, Kim Sampaio de Lacerda. Efeitos de diferentes protocolos de treinamento físico na expressão de genes relacionados a termogênese do tecido adiposo de camundongos com obesidade induzida pela dieta. 2018. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/32939>. Acesso em: 12 maio 2021.

MOSLEY, Michael; LYNCH, John. **Uma História da Ciência**. 1^oed. [S. l.]: Zahar, 2011.

PICOLI, Caroline de Carvalho *et al.* Peak Velocity as an Alternative Method for Training Prescription in Mice. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 42, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00042>

POOLE, David C *et al.* Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 318, n. 5, p. H1100–H1138, 2020.

TOTI, L. *et al.* High-intensity exercise training induces morphological and biochemical changes in skeletal muscles. **Biology of Sport**, v. 30, n. 4, p. 301–309, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5604/20831862.1077557>

WANG, Ningning *et al.* High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. **Life Sciences**, v. 191, p. 122–131, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.023>

WITKIN, Jeffrey M.; MORROW, Denise; LI, Xia. A rapid punishment procedure for detection of anxiolytic compounds in mice. **Psychopharmacology**, v. 172, n. 1, p. 52–57, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1618-4>