

Nathália Saffioti Rezende

A influência do pH na resposta metabólica óssea ao exercício

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2025

Nathália Saffioti Rezende

A influência do pH na resposta metabólica óssea ao exercício

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, desenvolvida dentro do Programa de Jovem Pesquisador da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de número 2019/05616-6, sob suporte de número 2022/09025-5 pela mesma instituição e aprovada pelo comitê de ética, com o CAAE 17970319.7.0000.0065.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientadora: Profa. Dra. Eimear Bernadette Dolan

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rezende, Nathália Saffioti

A influência do pH na resposta metabólica óssea ao
exercício / Nathália Saffioti Rezende; Eimear Bernadette Dolan,
orientador. -- São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo, 2025.

1.pH 2.Acidose 3.Metabolismo ósseo 4.Cloreto de amônio
5.Bicarbonato de sódio I.Dolan, Eimear Bernadette, orient.
II.Título

USP/FM/DBD-206/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

FOLHA DE APROVAÇÃO

REZENDE, NS. A influência do pH na resposta metabólica óssea ao exercício [Doutorado].
São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2025.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a)

Instituição:

Julgamento:

Prof.(a) Dr.(a)

Instituição:

Julgamento:

Prof.(a) Dr.(a)

Instituição:

Julgamento:

Dedico esta tese a:

Aos meus pais, por me ensinarem, com o exemplo, o valor do trabalho, da força e da persistência. Ser a primeira pessoa da família a ingressar em uma universidade pública foi um passo importante; concluir o doutorado é uma conquista que carrego com imenso orgulho. Essa trajetória só foi possível graças ao esforço incansável do meu pai, que sempre trabalhou para garantir qualidade de vida à nossa família, e à coragem da minha mãe diante dos desafios diários da vida como mulher e mãe.

À minha irmã e ao meu irmão, por tudo o que representam em minha vida. Minha irmã teve um papel fundamental na formação dos meus valores, do meu senso de responsabilidade e do desejo de transformar, por meio do meu trabalho, a realidade das pessoas ao meu redor. Meu irmão, com sua generosidade, sensibilidade e lealdade, é uma fonte constante de orgulho e inspiração. Levo cada um comigo em cada passo dessa caminhada.

Ao meu namorado, por caminhar ao meu lado com firmeza, respeito e incentivo. Por acreditar em mim, por me desafiar intelectualmente e por estar presente em todos os momentos de crise e incerteza. Sua presença me ofereceu – *e continua oferecendo* – a força necessária para que eu possa sempre continuar.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, que me acompanha desde a minha primeira iniciação científica, em 2018. Foi meu primeiro exemplo de liderança e continua sendo uma referência de inteligência, humildade, sensibilidade e inspiração. Ao longo desses anos, tive o privilégio de aprender não apenas com seus conhecimentos técnicos, mas também com sua postura ética, sua generosidade e sua maneira acolhedora de conduzir pessoas. Sinto-me profundamente honrada por ter sido sua orientanda e torço sinceramente por sua felicidade e sucesso em todas as esferas da vida.

À equipe que esteve comigo nas coletas de dados: Luisa, Gabriel, Letícia, Alina e Vithor. Foram longas jornadas no laboratório, muitas vezes com mais de sete horas seguidas de trabalho, sempre começando antes do amanhecer. Ainda assim, esses dias foram leves, produtivos e até divertidos, graças ao comprometimento, sintonia e dedicação de cada um de vocês. Sem essa equipe, essa tese simplesmente não teria sido possível.

À Luisa, em especial, minha primeira aluna de iniciação científica e hoje colega de profissão. Tenho por ela um carinho, respeito e admiração imensos. Refletir sobre o fato de ter contribuído, ainda que em parte, para sua formação é uma honra. Tenho certeza de que ela seguirá construindo uma trajetória admirável, porque é uma profissional competente, dedicada e com um enorme potencial.

Ao Gabriel, uma das pessoas mais inteligentes e humildes que já conheci. Sua postura ética, seu comprometimento e sua generosidade em compartilhar conhecimento – especialmente nas análises estatísticas – foram fundamentais ao longo do trabalho. Sou muito grata por tudo o que aprendi com você.

À minha melhor amiga, Letícia, que esteve ao meu lado em várias frentes. Além de colaborar diretamente no projeto, foi um pilar essencial na minha vida pessoal. Letícia é minha irmã de alma, uma das pessoas em quem mais confio e alguém que me conhece no olhar. Durante o período mais difícil que enfrentei até hoje, foi com a sua escuta e sensibilidade que consegui perceber onde estava e entender que era possível sair dali. Você foi fundamental para que eu começasse a me reconstruir.

RESUMO

Rezende, NS. A influência do pH na resposta metabólica óssea ao exercício [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

Introdução. A remodelação óssea é influenciada por múltiplos fatores, incluindo o ambiente ácido-base sistêmico, cuja modulação pode alterar a atividade celular óssea. **Objetivos.** Este estudo investigou como alterações agudas no pH sanguíneo, induzidas por bicarbonato de sódio (ALC) e cloreto de amônio (AC), afetam o equilíbrio ácido-base, os biomarcadores de metabolismo ósseo e o desempenho em *sprints* durante um protocolo de exercício intermitente de alta intensidade. **Metodologia.** Trata-se de um ensaio clínico randomizado, controlado, *cross-over* de dupla ocultação, conduzido com 12 homens saudáveis e treinados ($VO_{2pico} = 55.8 \pm 7.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Cada participante completou três sessões experimentais com diferentes intervenções (PLA, ALC, AC), realizando um teste de ciclismo de 125 minutos com intensidades variáveis (40% a 75% da potência máxima) e 6 *sprints* de alta intensidade, finalizando com um teste de Wingate de 30s. Amostras sanguíneas foram coletadas em repouso, durante e após o exercício para avaliação do pH, bicarbonato, cálcio ionizado (iCa), lactato, β -CTX-I, P1NP e PTH. **Resultados.** A alcalose metabólica reduziu as concentrações de iCa e promoveu maior aumento nos níveis de β -CTX-I ao longo do tempo, sugerindo maior mobilização óssea em resposta à menor disponibilidade de cálcio livre. Em contraste, a acidose elevou o iCa e atenuou a elevação do β -CTX-I, possivelmente por inibir a secreção de PTH. Não foram observadas diferenças significativas no desempenho físico entre as condições, embora a alcalose tenha provocado maior produção de lactato. **Conclusão.** A manipulação aguda do pH sanguíneo modulou os biomarcadores ósseos de maneira distinta, evidenciando que alterações transitórias no equilíbrio ácido-base podem impactar a resposta mineral óssea ao exercício. Embora esses achados tenham se mostrado contrários à hipótese inicial, eles ainda contribuem para a compreensão dos efeitos agudos da manipulação do pH sobre o metabolismo ósseo durante o exercício e levantam hipóteses relevantes para futuras investigações em contextos de esforço físico prolongado.

Palavras-chave: pH. Acidose. Metabolismo ósseo. Cloreto de amônio. Bicarbonato de sódio.

ABSTRACT

Rezende, NS. The influence of pH on the bone metabolic response to exercise [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2025.

Introduction. Bone remodeling is influenced by multiple factors, including the systemic acid–base milieu, whose modulation can alter osteoblastic and osteoclastic activity. **Objectives.** This study investigated how acute perturbations of blood pH, induced by sodium bicarbonate (ALC) and ammonium chloride (AC), affect acid-base balance, bone-metabolism biomarkers, and sprint performance during a high-intensity intermittent exercise protocol. **Methodology.** This was a randomized, controlled, double-blind, cross-over clinical trial conducted in 12 healthy, trained men (VO_2 peak = $55.8 \pm 7.2 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Each participant completed three experimental sessions (PLA, ALC, AC), performing a 125-min cycling test at variable intensities (40-75% of W max) with six high-intensity sprints, concluding with a 30-s Wingate test. Blood samples were collected at rest, during, and after exercise to assess pH, bicarbonate, ionized calcium (iCa), lactate, β -CTX-I, P1NP, and PTH. **Results.** Metabolic alkalosis reduced iCa concentrations and elicited a greater time-course increase in β -CTX-I, suggesting enhanced bone resorption in response to reduced free calcium availability. In contrast, acidosis elevated iCa and attenuated the rise in β -CTX-I, possibly via PTH-secretion inhibition. No significant differences in physical performance were observed between conditions, although alkalosis induced higher lactate production. **Conclusion.** Acute manipulation of blood pH distinctly modulates bone-metabolism biomarkers, demonstrating that transient shifts in acid–base balance can impact the skeletal mineral response to exercise. Although these findings contradicted the original hypothesis, they nonetheless advance our understanding of the acute effects of pH modulation on bone metabolism during exercise and generate pertinent hypotheses for future studies in prolonged-effort contexts.

Keywords: pH. Acidosis. Bone metabolism. Ammonium chloride. Sodium bicarbonate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Trajetória da massa óssea ao longo da vida em homens e mulheres	18
Figura 2 – Divisão entre osso cortical (compacto) e trabecular (esponjoso).....	20
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de remodelação óssea: ativação, reabsorção, reversão, formação e terminação (quiescência)	23
Figura 4 – Limiares mecânicos e suas implicações na adaptação óssea.....	26
Figura 5 – Visão geral do cronograma experimental do estudo.....	37
Figura 6 – Distribuição das curvas de erro tipo I (α) e erro tipo II (β) na análise de poder estatístico para ANOVA de medidas repetidas.....	38
Figura 7 – Composição calórica e distribuição de macronutrientes do café da manhã oferecido aos participantes.....	39
Figura 8 – Visão geral da primeira visita.....	41
Figura 9 – Visão geral do teste de ciclismo prolongado	42
Figura 10 – Fluxograma do recrutamento, exclusão e participação no estudo.....	49
Figura 11 – Distribuição do consumo alimentar nas diferentes condições de suplementação	51
Figura 12 – Evolução da Wpico e Wmed ao longo dos seis <i>sprints</i> nas diferentes condições experimentais	52
Figura 13 – Desempenho no teste de Wingate de 30 segundos nas diferentes condições	52
Figura 14 – Variação dos parâmetros sanguíneos ao longo do tempo nas diferentes condições de suplementação	53
Figura 15 – Gráficos de tendência das alterações no pH sanguíneo, bicarbonato sanguíneo (HCO_3^-), cálcio ionizado (iCa) e lactato ao longo do tempo nas diferentes condições	54
Figura 16 – Variação dos biomarcadores do metabolismo ósseo (β -CTX-I e P1NP) e PTH ao longo do tempo nas diferentes condições de suplementação	55
Figura 17 – Protocolo operacional utilizado no teste experimental	84
Figura 18 – Checklist utilizado na primeira visita ao laboratório	85
Figura 19 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no estudo	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físicas e de desempenho dos participantes do estudo	50
Tabela 2 – Dados e classificação do nível de desempenho dos participantes do estudo ...	50
Tabela 3 – Seções, temas e descrições do formulário de triagem	86

LISTA DE SIGLAS

%G	Percentual de gordura corporal
AC	Agente acidificante
ALC	Agente alcalino
ANOVA	Análise de Variância
BMMs	Biomarcadores do metabolismo ósseo
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
D	Densidade corporal
DMO	Densidade mineral óssea
DXA	Absorciometria por dupla energia de raios X
EPE	Erros Padrões de Estimativa
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCmax	Frequência cardíaca máxima
GUSB	Enzima beta-glucuronidase
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematócrito
HR-pQCT	Tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução
iCa	Cálcio ionizado
IGF-1	Fator de crescimento insulínico tipo 1
IL-1	Interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal
IPAQ	Questionário internacional de atividade física
ISAK	Sociedade Internacional para o Avanço da Cineantropometria
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MLG	Massa livre de gordura
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NO	Óxido nítrico
OPG	Osteoprotegerina
P1NP	Propeptídeo N-terminal do procólágeno tipo I

PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrogênio
Pi	Fosfato inorgânico
PL	Nível de performance
PLA	Placebo
POPs	Procedimentos operacionais padrão
PPi	Pirofosfato inorgânico
PSE	Percepção subjetiva de esforço
PTH	Paratormônio
RANKL	Ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa-B
RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TNAP	Fosfatase alcalina não específica do tecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TT	Trabalho total
VO ₂	Volume de oxigênio
VO ₂ max	Consumo máximo de oxigênio
VO2pico	Pico do consumo de oxigênio
Wmax	Potência máxima
Wmed	Potência média
β -CTX-I	β -C-terminal telopeptídeo do colágeno tipo I

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	INTRODUÇÃO AO TECIDO ÓSSEO.....	17
3.2	COMPOSIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO	18
3.2.1	Estrutura e revestimento do esqueleto.....	19
3.3	COMPONENTES CELULARES E REMODELAÇÃO ÓSSEA	21
3.3.1	Células envolvidas no processo de remodelação óssea	21
3.3.2	Fases do ciclo de remodelação óssea.....	22
3.4	BIOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO	24
3.5	EFEITO DO EXERCÍCIO NO METABOLISMO ÓSSEO	24
3.5.1	Efeitos crônicos do exercício físico.....	26
3.5.2	Efeitos agudos do exercício físico	27
3.6	CONTROLE METABÓLICO DO METABOLISMO ÓSSEO	29
3.6.1	Balanço oxidativo e remodelação óssea	30
3.6.2	Homeostase do cálcio e regulação do metabolismo ósseo	31
3.6.3	O impacto das alterações de pH no metabolismo ósseo.....	32
3.6.3.1	Efeitos do pH sobre osteoclastos e osteoblastos	33
3.6.3.2	Acidose induzida pelo exercício físico	34
4	JUSTIFICATIVA ESPECÍFICA PARA O ESTUDO	36
5	DESENHO DO ESTUDO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	37
5.1	PARTICIPANTES.....	37
5.2	PERÍODOS DE COLETA DE DADOS	38
5.3	VISITAS AO LABORATÓRIO	40
5.3.1	Primeira visita: baseline e teste incremental de VO₂max.....	40

5.3.2	Segunda visita: teste de familiarização	41
5.3.3	Visitas experimentais: teste de ciclismo prolongado.....	42
5.4	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	43
5.5	ANÁLISE DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO	43
5.6	PROTOCOLO DE SUPLEMENTAÇÃO	44
5.7	RECRUTAMENTO E SELEÇÃO.....	45
5.7.1	Critérios de exclusão.....	45
5.8	AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL	46
5.9	CLASSIFICAÇÃO DO NÍVEL DE DESEMPENHO	47
5.10	ASPECTOS ÉTICOS	47
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
6	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	49
6.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PARTICIPANTES.....	49
6.1.1	Classificação do nível de desempenho	50
6.1.2	Avaliação do consumo alimentar	51
6.2	PERFORMANCE DURANTE OS TESTES.....	51
6.3	EFEITO DAS INTERVENÇÕES NO EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE.....	53
6.4	EFEITO DAS INTERVENÇÕES NOS BIOMARCADORES ÓSSEOS	55
7	DISCUSSÃO	57
7.1	HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA E CRITÉRIOS DE DESEMPENHO	57
7.2	ANÁLISE DO CONSUMO ALIMENTAR	58
7.3	ALTERAÇÕES ÁCIDO-BASE E SUAS INTERAÇÕES COM O CÁLCIO	59
7.4	INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES DE PH NA PRODUÇÃO DE POTÊNCIA.....	60
7.5	METABOLISMO ÓSSEO FRENTE À MANIPULAÇÃO ÁCIDO-BASE	62
8	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	65
9	PERSPECTIVAS FUTURAS	66

CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICES.....	84
APÊNDICE A – Protocolo e checklist para as visitas ao laboratório	84
APÊNDICE B – Tabela do formulário de interesse no estudo	86
APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	87

1 INTRODUÇÃO

Os ossos desempenham funções essenciais no corpo humano, incluindo suporte estrutural, proteção de órgãos vitais e regulação da homeostase mineral¹. Para sustentar essas funções e adaptar-se às demandas fisiológicas e mecânicas, o tecido ósseo maduro passa por um ciclo contínuo de remodelação, no qual a reabsorção e a formação ocorrem de forma acoplada, ou seja, o processo de formação é sempre precedido pelo processo de reabsorção². Esse mecanismo é fundamental para a manutenção da massa óssea, permitindo que o osso antigo ou danificado seja substituído por um novo. Quando a formação predomina, há um aumento da densidade óssea, enquanto a reabsorção excessiva pode levar a condições como a osteoporose^{2,3}.

Todo esse processo é coordenado pela ação de diferentes tipos celulares, essenciais para a integridade do tecido ósseo. Entre eles, três tipos celulares desempenham papéis críticos: os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea; os osteócitos, que atuam como sensores mecânicos e reguladores da remodelação em resposta a estímulos biomecânicos e bioquímicos; e os osteoclastos, que reabsorvem a matriz óssea, contribuindo para o equilíbrio mineral²⁻⁵. A interação entre essas células é modulada por diversos fatores, como estímulos mecânicos⁶, variações de potencial de hidrogênio (pH)⁷, espécies reativas de oxigênio (ERO)⁸ e os níveis sistêmicos de cálcio⁹.

Dentre os fatores externos que impactam o metabolismo ósseo, o exercício físico desempenha um papel significativo¹⁰. Atividades de alto impacto, especialmente aquelas com estímulos multidirecionais, induzem respostas anabólicas, fortalecendo a estrutura óssea^{11,12}. Contudo, o exercício também provoca alterações agudas em vias metabólicas, como o estresse oxidativo e o pH do organismo, que atuam como sinalizadores na remodelação óssea, mas, quando exacerbadas, podem favorecer processos catabólicos¹⁰. Estudos sugerem que essas alterações incluem o aumento das ERO^{13,14}, que estimulam a atividade osteoclástica⁸, e a acidose metabólica transitória¹⁵, que pode inibir a atividade osteoblástica e estimular a osteoclástica⁷.

Apesar de avanços em estudos celulares e modelos animais, as evidências diretas sobre como flutuações fisiológicas de pH afetam o metabolismo ósseo humanos permanecem limitadas^{16,17}. Estudos indicam que a magnitude dessas alterações varia conforme o contexto: na acidose metabólica crônica de doenças como insuficiência renal avançada ou

cetoacidose diabética, o pH arterial costuma situar-se entre 7.20 a 7.30¹⁸, podendo cair abaixo de 7.0 em casos graves¹⁹, promovendo reabsorção óssea e reduzindo a formação²⁰. Em contraste, durante exercícios físicos intensos, ocorrem acidose metabólicas transitórias, nas quais o pH arterial pode declinar agudamente para aproximadamente 7.0 em esforços máximos²¹, porém a sua relevância para alterações no metabolismo ósseo em humanos ainda carece de evidências robustas^{16,22}.

Em contextos de exercício físico, o fator metabólico mais estudado relacionado à reabsorção óssea é o cálcio ionizado (iCa), que desempenha papel crítico na ativação do eixo paratormônio-osso^{23,24}. Uma recente metanálise conduzida por Dolan et al. (2022) reforça que a normalização dos níveis de iCa circulantes atenua, mas não previne completamente, o aumento do marcador β -C-terminal telopeptídeo do colágeno tipo I (β -CTX-I), indicador de reabsorção óssea amplamente utilizado²⁵. Esses achados sugerem a contribuição adicional de outras vias metabólicas na modulação do metabolismo ósseo induzido pelo exercício, como alterações agudas no equilíbrio ácido-base.

Porém, ainda não está esclarecida a magnitude exata e o papel específico das variações agudas do pH sanguíneo durante o exercício na remodelação óssea, especialmente considerando a interação com outros fatores metabólicos, como o cálcio ionizado^{17,25,26}. Compreender essas relações pode ser essencial para otimizar intervenções nutricionais e estratégias de treinamento, visando a preservação ou melhoria da saúde óssea, especialmente em indivíduos frequentemente expostos a condições metabólicas extremas, como atletas^{23,27}.

Diante dessas lacunas, este estudo propõe investigar o impacto das alterações de pH no metabolismo ósseo em humanos, com ênfase nas flutuações induzidas por suplementação e exercício físico. Por meio de intervenções que induzem alcalose, utilizando bicarbonato de sódio (NaHCO_3), ou acidose, utilizando cloreto de amônio (NH_4Cl), e de um protocolo de exercício intermitente de alta intensidade com duração de aproximadamente duas horas, será possível explorar a relação entre pH e o processo de remodelação óssea, utilizando os principais biomarcadores de formação, o propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo I (P1NP), e de reabsorção óssea, o β -CTX-I.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese é investigar, em homens adultos saudáveis, como as alterações agudas de pH, induzidas por bicarbonato de sódio e cloreto de amônio, e um protocolo de exercício intermitente de alta intensidade impactam o metabolismo ósseo em humanos, analisando as respostas metabólicas ósseas por meio de biomarcadores específicos.

Os objetivos específicos são:

1. **Avaliar a magnitude das alterações de pH sanguíneo ao longo de um teste prolongado de ciclismo, intercalado com *sprints* intermitentes**, decorrentes da administração pré-exercício de bicarbonato de sódio e cloreto de amônio, analisando seu impacto nas concentrações de bicarbonato, iCa e no equilíbrio ácido-base;
2. **Quantificar as respostas agudas dos biomarcadores de remodelação óssea β -CTX-I, P1NP e PTH**, avaliando se há variações significativas entre as condições alcalina (NaHCO_3), acidificante (NH_4Cl) e placebo, e como essas variações se associam às flutuações do pH sanguíneo.

Adicionalmente, como desfecho secundário, será analisado o impacto das alterações de pH no desempenho dos *sprints*, considerando os parâmetros de potência média e potência máxima ao longo dos seis *sprints* realizados durante o teste, bem como a potência máxima, média, tempo para o pico e trabalho total no teste de Wingate.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 INTRODUÇÃO AO TECIDO ÓSSEO

Os ossos são tecidos conjuntivos especializados que desempenham funções essenciais para o corpo humano, abrangendo aspectos mecânicos e metabólicos¹. Além de fornecer suporte estrutural e proteção aos órgãos, eles contribuem com a locomoção e funcionam como reservatórios dinâmicos de minerais, como cálcio e fosfato²⁸, fundamentais para a homeostase mineral¹. Nos últimos anos, pesquisas ampliaram a compreensão sobre os ossos, destacando seu papel como órgãos endócrinos, capazes de regular o metabolismo energético²⁹ e a homeostase mineral por meio de hormônios como a osteocalcina, produzida pelos osteoblastos^{30,31}. Essa proteína influencia a secreção e a sensibilidade à insulina, destacando a contribuição do osso para funções sistêmicas além do suporte estrutural³¹.

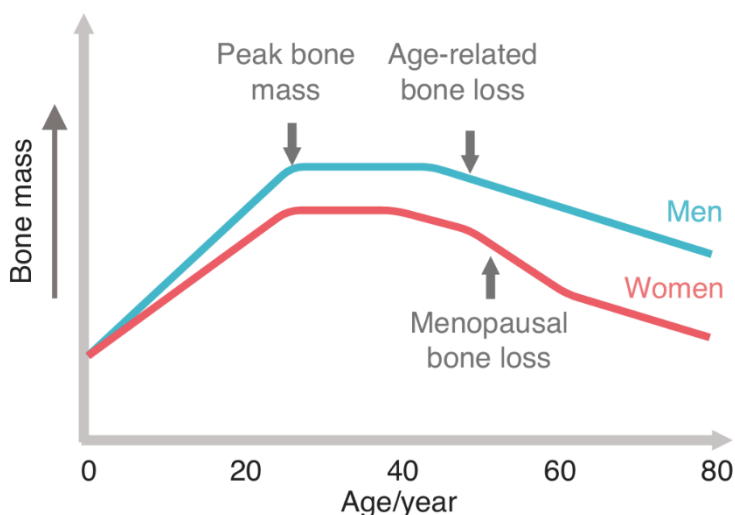
Outro exemplo de regulação sistêmica do osso é o controle dos níveis de cálcio no sangue, mediado pela interação entre o paratormônio (PTH) e a vitamina D. O PTH atua estimulando a reabsorção óssea para liberar cálcio na circulação quando os níveis estão baixos³², enquanto a vitamina D tem um papel central na absorção de cálcio no intestino³³. Em casos de insuficiência de cálcio ou vitamina D, o organismo mobiliza cálcio do osso para manter a homeostase sanguínea^{28,34}. Assim, os ossos desempenham um papel central na proteção contra desequilíbrios metabólicos, consolidando sua relevância além das funções mecânicas tradicionais.

Para manter o equilíbrio entre as funções mecânicas e metabólicas, o tecido ósseo passa por um processo dinâmico e constante de reabsorção e formação, chamado remodelação óssea^{1,6}. Esse mecanismo permite que o osso repare microdanos causados pelo desgaste cotidiano e se adapte às forças externas^{2,4,35}. Durante a infância, o processo de modelação óssea é predominante, com a formação e reabsorção ocorrendo de maneira independente, resultando em um aumento líquido de massa óssea³⁶. Na fase adulta, a remodelação assume maior importância, caracterizada por uma interação acoplada entre os processos³. Contudo, com o envelhecimento, o equilíbrio entre formação e reabsorção torna-se negativo, levando à perda progressiva de massa óssea e ao aumento da susceptibilidade a fraturas³⁷.

A **Figura 1** ilustra essa trajetória da massa óssea ao longo da vida, destacando o rápido ganho durante o crescimento puberal, o alcance do pico de massa óssea na fase

adulta e o declínio progressivo associado ao envelhecimento. Observa-se que, embora ambos os sexos apresentem perda óssea com o avançar da idade, as mulheres sofrem um declínio acentuado no período pós-menopausa, enquanto nos homens essa redução ocorre de forma mais gradual ao longo do envelhecimento³⁸.

Figura 1 – Trajetória da massa óssea ao longo da vida em homens e mulheres



Fonte: Zhang e colaboradores (2024).

Diante disso, essa revisão bibliográfica explora os fundamentos biológicos e funcionais da remodelação óssea, com ênfase nos efeitos do equilíbrio ácido-base sobre a homeostase mineral⁷. Em particular, a interação entre o estresse mecânico do exercício e as flutuações no pH sanguíneo surge como um aspecto relevante para compreender as adaptações ósseas em diferentes contextos fisiológicos³⁹.

3.2 COMPOSIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é formado por três principais frações: matéria inorgânica, matéria orgânica e água⁴⁰. Aproximadamente 60% de sua massa é formada por componentes inorgânicos, 8-10% corresponde à água, e o restante é constituído por matéria orgânica⁴⁰. A integração desses elementos confere ao osso resistência mecânica e capacidade de absorver impacto, garantindo suas funções estruturais e metabólicas.

A fração inorgânica é composta predominantemente por cristais de hidroxapatita (fosfato de cálcio cristalino), que conferem ao osso rigidez e resistência à compressão^{3,5}. Modificações químicas podem ocorrer nesses cristais, como a substituição de grupos fosfato

por carbonato ou de íons cálcio por magnésio e sódio, o que influencia sua solubilidade e resistência mecânica⁴¹. A menor cristalinidade da hidroxiapatita pode facilitar a liberação de íons cálcio em condições metabólicas específicas, como variações no equilíbrio ácido-base² (ver **Seção 3.6.3**, sobre os efeitos do pH na homeostase óssea). Além disso, a presença de elementos como sódio, magnésio e flúor auxilia na estabilidade estrutural do tecido ósseo^{5,40}.

A matriz orgânica do osso é formada principalmente por colágeno tipo I, que representa cerca de 95% da matriz orgânica e proporciona flexibilidade e resistência à tração⁴⁰. Além do colágeno, a matriz contém glicoproteínas, proteoglicanos, e proteínas não colagênicas, como a osteocalcina, que participa da regulação da atividade osteoclástica e do metabolismo mineral⁵. Algumas dessas proteínas possuem sequências específicas de aminoácidos, como arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), que facilitam a adesão celular e a sinalização entre osteoblastos, osteoclastos e osteócitos⁴².

Além de fornecer suporte estrutural, o tecido ósseo desempenha funções metabólicas críticas, como a regulação da homeostase mineral e a liberação de fatores de crescimento e citocinas, incluindo o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e o fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1), que estão envolvidos nos processos de formação e reabsorção óssea², além de participarem de diversos outros processos fisiológicos. Esses mediadores atuam na remodelação óssea em resposta a estímulos biomecânicos e metabólicos, incluindo alterações no pH⁴³. A influência dessas variações ácido-base no metabolismo ósseo, foco central desta tese, será explorada ao longo do trabalho.

A organização do tecido ósseo reflete sua necessidade de equilibrar resistência mecânica e função metabólica⁴⁴, como citado anteriormente. Em nível estrutural, o esqueleto se divide em osso cortical, denso e compacto, e osso trabecular, altamente poroso e metabolicamente mais ativo⁵. Essa distribuição estrutural influencia diretamente a resposta do tecido ósseo a estímulos mecânicos e bioquímicos^{45,46}. A macro e a microarquitetura óssea, assim como suas implicações funcionais, serão discutidas nas próximas seções, que abordam a organização do tecido ósseo e sua interação com processos adaptativos, como a remodelação óssea e a resposta ao exercício físico^{39,47}.

3.2.1 Estrutura e revestimento do esqueleto

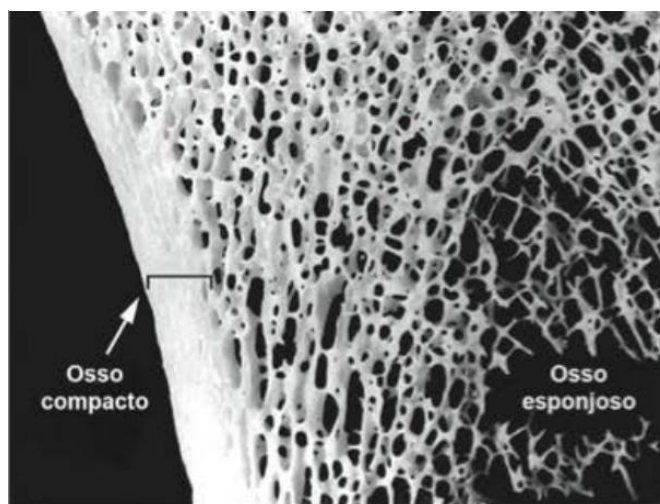
O esqueleto humano é dividido em esqueleto axial e apendicular. O esqueleto axial compreende o crânio, a coluna vertebral, as costelas e o esterno, sendo responsável pelo

suporte estrutural e pela proteção de órgãos vitais⁴⁴. Já o esqueleto apendicular inclui os ossos dos membros superiores e inferiores, além das cinturas escapular e pélvica, desempenhando papel fundamental na locomoção^{1,44}.

Nos ossos longos do esqueleto apendicular distinguem-se três regiões: epífise, metáfise e diáfise. As epífises, situadas nas extremidades, contêm predominantemente osso trabecular – tecido altamente poroso e de rápida remodelação¹. A diáfise forma o corpo central, composto quase exclusivamente por osso cortical, denso e pouco poroso, que garante rigidez e resistência mecânica⁴⁴. Entre essas porções encontra-se a metáfise, zona de transição onde se localiza a placa epifisária durante o crescimento^{1,44}. A distribuição desigual de osso cortical e trabecular faz com que cada região responda de maneira específica a estímulos mecânicos e metabólicos.

A **Figura 2**⁵ ilustra essa arquitetura: o osso cortical compacto (5–20 % de porosidade) reveste a diáfise e circunda o compartimento trabecular nas extremidades, suportando sobretudo cargas de compressão⁴⁴. O osso trabecular, por sua vez, apresenta uma rede leve e altamente porosa (50–90 %), que distribui as cargas, armazena medula óssea e sustenta elevada atividade metabólica^{5,40}.

Figura 2 – Divisão entre osso cortical (compacto) e trabecular (esponjoso)



Fonte: Junqueira e Carneiro (2013).

Além das diferenças na composição, o metabolismo ósseo também varia entre esses dois tipos de tecido. O osso trabecular é mais responsivo a alterações metabólicas, incluindo mudanças no pH^{6,40}. Estudos sugerem que a acidose metabólica pode afetar de maneira

diferente esses compartimentos⁷, tornando o osso trabecular mais suscetível à reabsorção devido à sua maior superfície de contato e renovação celular.

Por fim, o tecido ósseo é revestido por duas membranas principais: o periósteo e o endósteo⁵. O periósteo recobre a superfície externa do osso, exceto nas áreas articulares, e é formado por uma camada externa rica em fibras colágenas e vasos sanguíneos, além de uma camada interna composta por células osteogênicas envolvidas na formação óssea e reparação óssea⁴⁴. O endósteo, por sua vez, reveste as cavidades internas do osso, incluindo canais medulares e espaços trabeculares, e é constituído por células osteoblásticas, osteoclásticas e de revestimento, essenciais para a remodelação óssea^{5,44}.

3.3 COMPONENTES CELULARES E REMODELAÇÃO ÓSSEA

A remodelação óssea ocorre por meio da interação entre osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, garantindo a manutenção da estrutura óssea ao longo da vida². As subseções a seguir detalham a função e a regulação desses tipos celulares, abordando como sua atividade é influenciada por fatores mecânicos e metabólicos.

3.3.1 Células envolvidas no processo de remodelação óssea

Os osteoblastos, originados de células-tronco mesenquimais, são responsáveis pela síntese e mineralização da matriz óssea⁴⁴. Além disso, os osteoblastos regulam a reabsorção óssea por meio da produção do receptor ativador de fator nuclear kappa-B (RANKL), que promove a diferenciação osteoclástica, e da osteoprotegerina (OPG), que atua como um inibidor competitivo ao se ligar ao RANKL e impedir sua interação com o receptor nos osteoclastos⁴⁸.

Além de sua função na formação óssea, uma fração dos osteoblastos sofre diferenciação para osteócitos, células que permanecem inseridas na matriz mineralizada e atuam como sensores mecânicos, regulando a remodelação óssea^{44,49}. Os osteócitos detectam variações biomecânicas e metabólicas, ajustando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos conforme as demandas estruturais^{45,46}. Estudos demonstram que a ausência de estímulos mecânicos, como em casos de imobilização prolongada, induz apoptose de osteócitos⁵⁰. Esse processo desencadeia um sinal bioquímico que estimula a reabsorção óssea pelos osteoclastos e, conseqüentemente, leva à perda de massa óssea⁵¹.

Além de sua função na regulação mecânica, os osteócitos também modulam a remodelação óssea por meio da secreção de esclerostina, um inibidor da via Wnt/ β -catenina que reduz a formação óssea⁵². A produção de esclerostina é reprimida por estímulos mecânicos e aumentada em condições de ausência de carga^{45,46}. Evidências sugerem que variações no pH também podem influenciar essa resposta, impactando a formação óssea^{53,54}.

Os osteoclastos, por sua vez, são derivados da linhagem hematopoiética e atuam diretamente na reabsorção óssea, degradando a matriz mineralizada e o colágeno tipo I^{3,48}. Sua atividade é regulada pelo equilíbrio entre RANKL e OPG, que modulam sua diferenciação e ativação⁴⁸. Além disso, citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), aumentam a expressão de RANKL e reduzem a de OPG, promovendo um aumento da reabsorção óssea⁵⁵.

3.3.2 Fases do ciclo de remodelação óssea

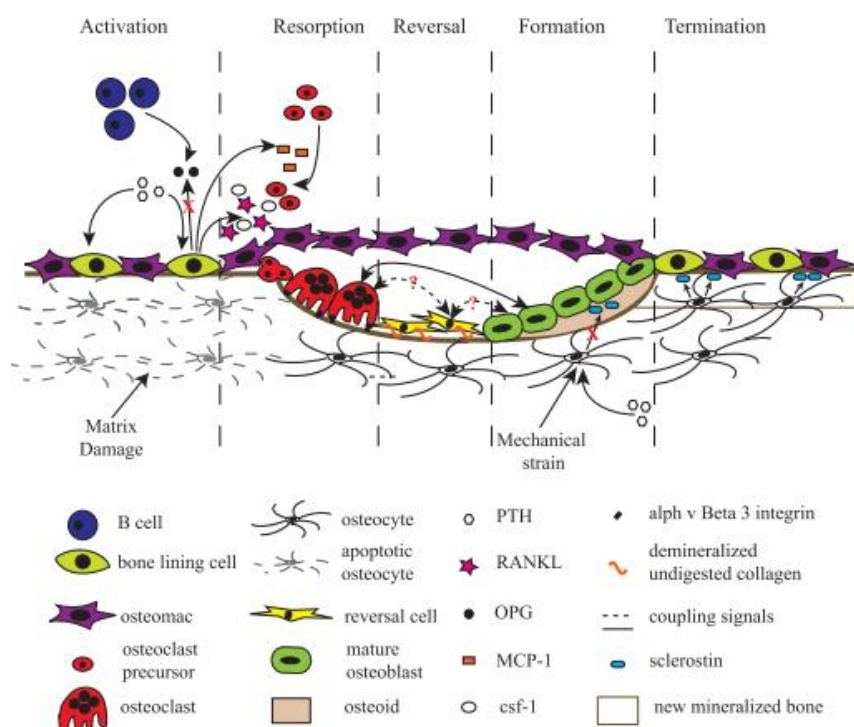
O modelo proposto por Parfitt⁴⁷ oferece uma visão detalhada das etapas sequenciais do processo de remodelação óssea, que envolvem diferentes tipos celulares e sinais reguladores. Cada fase do ciclo desempenha um papel crucial na renovação do tecido ósseo, seja promovendo a reabsorção de matriz mineralizada antiga ou facilitando a deposição de novo material ósseo. A **Figura 3** representa essas etapas e destaca as interações celulares e moleculares que ocorrem durante o processo, incluindo a regulação por estímulos mecânicos e metabólicos, como será discutido nas **Seções 5 e 6**, respectivamente. A seguir, são detalhadas as seis fases sequenciais descritas no modelo de Parfitt:

1. **Quiescência:** durante esta fase inicial, as superfícies ósseas são cobertas por uma camada de osteoblastos inativos, conhecidos como células de revestimento. Essas células mantêm a superfície do osso protegida até que sejam ativadas por sinais externos. Fatores hormonais, mecânicos ou metabólicos, como o PTH, o exercício físico, e alterações no pH, podem ativar o processo de remodelação^{17,53};
2. **Ativação:** nesta fase, as células de revestimento retraem-se, expondo a superfície óssea, e enzimas proteolíticas, como a collagenase, preparam o local para a chegada dos osteoclastos;
3. **Reabsorção:** os osteoclastos aderem à superfície óssea e liberam enzimas, como a catepsina K, para degradar a matriz mineralizada⁴⁸. Esse processo forma as lacunas

de Howship, que são depressões na superfície óssea resultantes da atividade osteoclástica, liberando cálcio e fósforo na corrente sanguínea⁵⁶. Esse mecanismo é regulado por fatores como RANKL e OPG^{47,48};

4. **Reversão:** monócitos e outras células removem resíduos da matriz óssea, preparando a superfície para a deposição do osteoide. Apesar da relevância dessa fase, os mecanismos que orquestram essa transição ainda são pouco compreendidos, representando uma importante lacuna na literatura;
5. **Formação:** os osteoblastos migram para a região remodelada e depositam osteoide, que posteriormente se mineraliza, restaurando a densidade e resistência óssea. Fatores como TGF- β e IGF-1, liberados durante a reabsorção, influenciam esse processo^{57,58}, enquanto estímulos mecânicos desempenham papel importante na ativação dos osteoblastos⁴⁵;
6. **Retorno à quiescência:** ao final do processo, parte dos osteoblastos sofre apoptose, enquanto outros se diferenciam em osteócitos ou retornam ao estado de células de revestimento, concluindo o ciclo e preparando o osso para novas demandas.

Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de remodelação óssea: ativação, reabsorção, reversão, formação e terminação (quiescência)



Fonte: Ragatt e Partridge (2010).

3.4 BIOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO

Os biomarcadores do metabolismo ósseo (BMMs) são amplamente utilizados para avaliar as respostas do tecido ósseo em estudos agudos²⁵. Ao contrário de técnicas de imagem como absorciometria por dupla energia de raios X (DXA) e tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução (HR-pQCT) – que fornecem apenas uma visão estática do estado ósseo e demandam meses para evidenciar alterações na remodelação – os BMMs oferecem informações dinâmicas, pontuais e sensíveis às respostas agudas de formação e reabsorção óssea⁵⁹. Entre os principais BMMs, destacam-se o P1NP e o β -CTX-I, recomendados pela *National Bone Health Alliance* devido à sua alta especificidade e menor variabilidade biológica.

O P1NP reflete a atividade osteoblástica e a síntese de colágeno tipo I, sendo um dos biomarcadores mais confiáveis para avaliar a formação óssea⁶⁰. Por ser sensível a estímulos metabólicos e mecânicos, sua interpretação em estudos longitudinais fornece insights importantes sobre adaptações no metabolismo ósseo²⁵. O β -CTX-I é um marcador de degradação do colágeno tipo I, associado à atividade osteoclástica e à reabsorção óssea. Sua rápida resposta a mudanças fisiológicas faz dele um excelente indicador para avaliar os efeitos agudos do exercício sobre a reabsorção óssea⁵⁹.

3.5 EFEITO DO EXERCÍCIO NO METABOLISMO ÓSSEO

A carga mecânica induzida pela atividade física desempenha papel fundamental na adaptação estrutural do tecido ósseo, regulando a densidade e a arquitetura do esqueleto de acordo com as demandas funcionais impostas ao sistema musculoesquelético^{6,30,46}. Esse fenômeno, denominado mecanotransdução, permite ao tecido ósseo converter estímulos mecânicos em respostas celulares e moleculares, ajustando-se continuamente às exigências biomecânicas e mantendo sua homeostase^{45,61}.

Os osteócitos, principais sensores mecânicos do tecido ósseo, percebem variações de carga por meio do fluxo de fluido intersticial gerado quando o osso é submetido a tensões de compressão, tração ou cisalhamento⁵². Esse deslocamento de fluido ativa mecanorreceptores cuja natureza ainda não está completamente elucidada, mas que provavelmente envolvem canais iônicos transmembrana, componentes do citoesqueleto, integrinas, conexinas e mecanismos mediados por influxo de cálcio^{30,62}.

Uma vez detectado o estímulo mecânico, inicia-se uma série de cascatas de sinalização intracelular que modulam a atividade de osteoblastos e osteoclastos, influenciando diretamente a remodelação óssea⁴⁵. Entre os mecanismos envolvidos, destacam-se a liberação de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, a ativação da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e da via Wnt/ β -catenina, além do aumento na expressão de genes mecanossensíveis^{63,64}. Estudos indicam que a carga mecânica também afeta a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), estimulando a proliferação de células osteogênicas e a síntese de colágeno, com aumento significativo nos níveis de mRNA de IGF-1 após cerca de seis horas de estímulo^{45,46,58}.

A magnitude das adaptações ósseas desencadeadas pela carga mecânica varia entre indivíduos, influenciada por fatores como idade³⁷, status hormonal^{17,55}, perfil genético⁹, nível nutricional²² e qualidade da recuperação^{65,66}. Do ponto de vista funcional, diferentes padrões de carga produzem efeitos distintos no metabolismo ósseo: atividades de alto impacto e movimentos com forças multidirecionais tendem a gerar maiores estímulos osteogênicos em comparação a exercícios cíclicos de baixo impacto^{11,49}. Esportes como ginástica⁶⁷ e *rugby*⁶⁸, por exemplo, promovem maior formação óssea em razão das cargas gravitacionais e impactos repetidos, enquanto modalidades como natação e ciclismo⁶⁹, que envolvem menor solicitação gravitacional, podem não ser tão eficazes na preservação ou ganho de densidade mineral óssea. Nesses casos, a inclusão de exercícios resistidos e pliométricos na rotina de treinamento surge como estratégia para potencializar o estímulo mecânico e, conseqüentemente, a adaptação óssea¹¹.

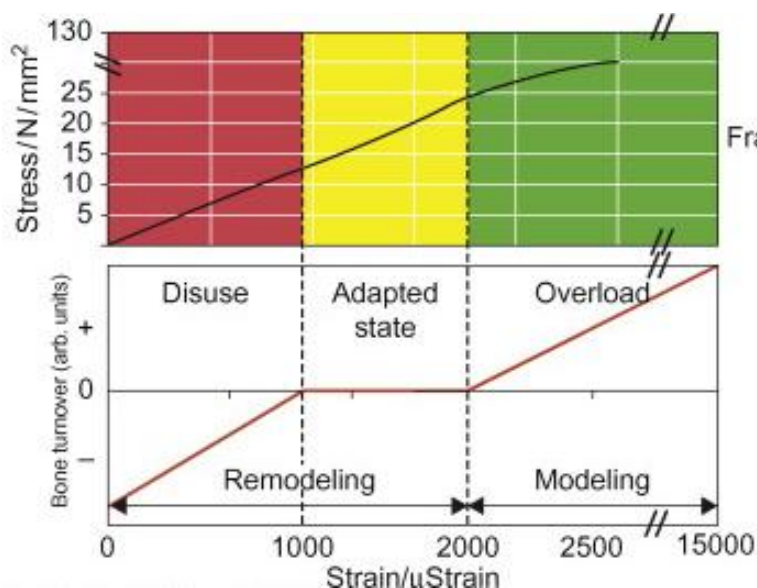
Para compreender esses fenômenos, destaca-se a Teoria do Mecanostato⁷⁰, proposta por Harold Frost, que descreve a regulação da massa e estrutura óssea em resposta ao estresse mecânico. Segundo esse modelo, o osso ajusta-se a diferentes intensidades de carga para manter sua competência estrutural⁷¹, classificando a resposta óssea em três zonas principais, como descrito na **Figura 4**:

- **Desuso** (< 800 μ strain): a baixa carga mecânica favorece a reabsorção óssea, resultando em perda de massa e força óssea;
- **Estado adaptado** (800 – 1500 μ strain): o estímulo mecânico é suficiente para manter a homeostase, equilibrando formação e reabsorção;

- **Sobrecarga** ($> 1500 \mu\text{strain}$): a carga mecânica intensa, porém ainda dentro dos limites fisiológicos, estimula a formação óssea adaptativa; valores excessivos – isto é, sobrecarga patológica – podem evoluir para fraturas por estresse.

A **Figura 4** sintetiza como diferentes magnitudes de carga influenciam o turnover ósseo⁷¹: a remodelação predomina nas zonas de desuso e adaptação, enquanto a modelagem óssea – responsável pelo ganho líquido de massa – ocorre principalmente na zona de sobrecarga³⁶. Esse modelo reforça o papel central da carga mecânica na regulação do metabolismo ósseo e contribui para explicar por que atividades de alto impacto e padrão intermitente são mais eficazes na estimulação da osteogênese^{36,69}. Uma vez que, como discutido anteriormente, não apenas a magnitude da carga, mas também a variabilidade e a direção dos estímulos influenciam a resposta óssea, conclui-se que movimentos multidirecionais e picos de carga abruptos apresentam maior potencial osteogênico do que estímulos repetitivos e unidimensionais⁴⁹.

Figura 4 – Limiares mecânicos e suas implicações na adaptação óssea



Fonte: Felsenberg e Runge (2010).

3.5.1 Efeitos crônicos do exercício físico

Dada a importância da carga mecânica na regulação do metabolismo ósseo, diversos estudos têm investigado os efeitos crônicos do exercício físico sobre a saúde esquelética. A maior parte das evidências aponta que a exposição prolongada ao treinamento promove o aumento dos níveis basais de biomarcadores de formação óssea^{12,25}, melhora da

densidade mineral óssea (DMO)²⁸ e aprimoramento da microarquitetura óssea¹², avaliada por HRpQCT. No entanto, tais respostas adaptativas não ocorrem de forma universal. Evidências recentes sugerem que, sob determinadas condições, o exercício físico pode deixar de exercer efeito anabólico e, em alguns casos, comprometer a integridade óssea¹⁷.

Esse risco é particularmente evidente em atletas submetidos a volumes elevados de treinamento concomitantes à ingestão energética inadequada. Nesses casos, observa-se maior risco de perda óssea, mesmo em fases da vida em que tipicamente ocorre acúmulo de massa óssea²⁵. Essa condição, comumente observada em esportes de endurance^{11,72}, está associada a um ambiente metabólico desfavorável, caracterizado por reduções nos níveis de IGF-1, T3 e esteroides sexuais, além de elevações de cortisol e PTH⁷², o que pode comprometer o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.

Além do estado energético e hormonal, a especificidade da modalidade esportiva influencia significativamente os efeitos crônicos do exercício sobre o tecido ósseo²⁶. Como discutido na **seção anterior**, esportes com impacto intermitente, como corrida e saltos, proporcionam estímulos osteogênicos mais expressivos quando comparados àqueles com suporte de peso corporal, como a natação e o ciclismo^{36,49}. Nestas últimas modalidades, a ausência de impacto repetitivo está associada a menores ganhos de DMO, especialmente em regiões como a coluna lombar e o quadril⁷³.

Adicionalmente, exercícios prolongados ou de alta intensidade impõem estresse fisiológico sistêmico, o qual pode incluir alterações na homeostase do cálcio e do pH sanguíneo⁷⁴. Tais alterações favorecem a liberação aumentada de PTH, que pode levar o aumento da reabsorção óssea⁷⁵. Embora o exercício físico represente um estímulo anabólico potente para o osso, sua eficácia é modulada por variáveis como o tipo de atividade, o estado nutricional, o perfil hormonal e o controle do estresse metabólico²⁵. A ausência de consenso quanto à dose, intensidade e frequência ideais de treinamento reforça a importância de considerar esses fatores de maneira integrada, especialmente em populações vulneráveis, como adolescentes, idosos e indivíduos com condições clínicas específicas^{12,25}.

3.5.2 Efeitos agudos do exercício físico

Enquanto as adaptações crônicas do tecido ósseo decorrem da repetição contínua de estímulos mecânicos e metabólicos, as respostas agudas ao exercício físico constituem

um modelo experimental valioso para investigar mecanismos fisiológicos imediatamente ativados após o esforço. Identificar esses fatores que modulam o metabolismo ósseo em curto prazo é relevante porque, quando recorrentes, podem contribuir para adaptações benéficas ou deletérias ao longo do tempo^{12,25}.

Nesse contexto, a metanálise de Dolan e colaboradores (2022) quantificou o efeito de uma única sessão de exercício sobre os principais biomarcadores ósseos, analisando potenciais moderadores (características dos participantes, tipo de exercício, intensidade, duração, estado nutricional etc.)²⁵. A partir dela, é possível observar que uma única sessão de exercício físico é capaz de provocar elevações discretas nos níveis séricos de β -CTX-I (SMD $\approx +0.10$) e P1NP (SMD $\approx +0.05$). Embora estatisticamente sugiram tendência de aumento, a magnitude foi classificada como muito pequena, e os intervalos de credibilidade abrangeram valores próximos a zero em muitos casos²⁵. Em outras palavras, a resposta “média” do osso a um exercício agudo é limitada, sugerindo que fatores específicos de cada protocolo ou indivíduo determinam efeitos mais pronunciados.

Esse padrão de variabilidade também foi evidenciado na própria metanálise, que identificou maior reabsorção óssea em modalidades prolongadas, cíclicas e com baixa sobrecarga mecânica, como o ciclismo contínuo. Nessas condições, o β -CTX-I apresentou aumento significativo ($F = 0.65$), com pico entre 15 minutos e duas horas após o esforço. Em contraste, exercícios com maior impacto osteogênico (corrida ou treinamento resistido) não mostraram elevações agudas mensuráveis de β -CTX-I, indicando que essa reabsorção transitória reflete predominantemente demandas metabólicas sistêmicas (*p.e.*, alterações na calcemia, acidose ou mobilização de tampões, analisados em maior profundidade na **Seção 3.6**), ao invés de resultar diretamente da carga mecânica local.

Dentro desse panorama, o estudo de Kohrt e colaboradores (apresentado em detalhes na **Seção 3.6.2**) e o de Wherry e colaboradores (2021) estão entre aqueles que reportaram maiores tamanhos de efeito ($F = 1.18$ e 0.94 , respectivamente)^{17,25,76}. Eles reforçam a ideia de que a remodelação óssea em resposta ao exercício não se deve apenas à homeostase do cálcio, mas a múltiplos fatores sistêmicos. No experimento de Wherry, a infusão intravenosa de cálcio durante 60 minutos de caminhada vigorosa em adultos mais velhos (61 ± 6 anos) reduziu significativamente os aumentos de PTH e β -CTX-I em comparação à infusão de soro fisiológico⁷⁶. Entretanto, a supressão não foi completa: mesmo com a iCa

mantida estável, houve elevação residual de β -CTX-I e PTH, sugerindo que outros mecanismos, como a acidose metabólica, também participam da ativação aguda da reabsorção óssea.

Em contraste, os marcadores de formação óssea sofrem alterações mínimas e transitórias após uma sessão de exercício. A metanálise de Dolan e colaboradores (2022) relatou incrementos muito pequenos em P1NP, osteocalcina e fosfatase alcalina óssea, que retornaram aos níveis basais rapidamente (em muitos casos, em até 15 minutos), sem tendências significativas em função dos moderadores investigados²⁵. Dessa forma, o potencial osteogênico do exercício talvez não se reflita diretamente em aumentos detectáveis na atividade sistêmica dos osteoblastos; efeitos anabólicos possivelmente ocorrem em período mais tardio ou por adaptações locais não captadas pelos marcadores séricos agudos. Essa hipótese é reforçada pela maior elevação de β -CTX-I no ciclismo prolongado, modalidade de baixo estímulo mecânico, enquanto treinos resistidos e de impacto, tradicionalmente considerados osteogênicos, não apresentaram alterações agudas detectáveis²⁵.

Em síntese, o exercício físico provoca elevações agudas e predominantemente transitórias nos marcadores de reabsorção óssea, enquanto os de formação apresentam alterações discretas e de curta duração. Embora essas respostas não impliquem necessariamente efeito deletério – podendo refletir mecanismos compensatórios frente a distúrbios transitórios como hipocalcemia ou acidose – episódios intensos e frequentes, sem adequada recuperação ou suporte nutricional, podem favorecer efeitos catabólicos cumulativos. A interpretação dessas alterações exige cautela, considerando o tipo de exercício, o estado fisiológico e os potenciais mediadores sistêmicos envolvidos. Dado que ainda é incerto como essas respostas agudas se traduzem em adaptações ósseas no longo prazo, é importante reconhecer que cada estudo experimental contribui como uma peça valiosa para a compreensão geral desse fenômeno. Nesse contexto, as alterações no pH sanguíneo emergem como um possível modulador sistêmico ainda pouco compreendido, justificando sua investigação mais aprofundada, como proposto na presente tese.

3.6 CONTROLE METABÓLICO DO METABOLISMO ÓSSEO

A literatura existente sugere que perturbações metabólicas, como condições inflamatórias, estresse oxidativo e acidose metabólica, também podem desempenhar um papel

crítico na regulação do metabolismo ósseo⁷⁷. Essas condições, embora possuam características distintas, podem ser observadas tanto em doenças crônicas⁵³ quanto, de forma transitória, durante a prática de exercício físico intenso⁷⁷, constituindo, portanto, um modelo relevante para investigar tais interações.

3.6.1 Balanço oxidativo e remodelação óssea

O balanço oxidativo refere-se ao equilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a capacidade antioxidante do organismo em neutralizá-las ou removê-las⁷⁸. A ruptura desse equilíbrio, seja por um aumento excessivo da produção de oxidantes ou por uma redução nas defesas antioxidantes, leva ao chamado estresse oxidativo. Nesse contexto, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas altamente reativas que podem desempenhar um papel duplo no metabolismo ósseo. Em concentrações moderadas e transitórias, as ERO atuam como mensageiros intracelulares importantes, regulando vias de sinalização envolvidas na remodelação óssea e estimulando adaptações fisiológicas⁷⁹. Entretanto, em concentrações elevadas ou prolongadas, podem induzir apoptose celular, danos teciduais e prejuízos à integridade óssea⁸⁰.

Mecanicamente, níveis elevados de ERO afetam diretamente as células envolvidas na remodelação óssea. As ERO podem aumentar a sensibilidade dos precursores de osteoclastos ao RANKL, elevando a expressão de RANKL e de M-CSF e reduzindo seu antagonista OPG, o que favorece a formação e atividade de osteoclastos⁸¹. Simultaneamente, ERO em excesso suprimem a função osteoblástica, inibindo a diferenciação de osteoblastos e induzindo apoptose de osteoblastos e osteócitos⁸².

No contexto do exercício físico agudo, há um aumento transitório na produção de ERO⁷⁷. Estudos sugerem que o exercício físico agudo pode elevar temporariamente biomarcadores de reabsorção óssea, e o estresse oxidativo tem sido considerado um possível mediador desse processo, embora sua relação causal ainda não tenha sido diretamente investigada⁸¹. Evidências provenientes de estudos experimentais – tanto *in vitro* quanto *in vivo* – demonstram que antioxidantes modulam a formação de osteoclastos e mitigam os efeitos das ERO no osso⁸⁰. Por exemplo, em culturas celulares de precursores osteoclásticos, compostos antioxidantes (como a rutina e o ácido α -lipóico) suprimem a diferenciação de osteoclastos induzida por estímulos oxidativos, ao reduzir os níveis intracelulares de ROS e consequentemente inibir a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) nessas células^{83,84}. Da

mesma forma, estudos em modelos animais de osteopenia induzida por estresse oxidativo, a suplementação com antioxidantes (como a N-acetilcisteína e a vitamina C) resulta em menor atividade osteoclástica e prevenção da perda óssea, associadas à queda na produção de citocinas pró-osteoclastogênicas como o TNF- α ^{85,86}.

Contudo, o uso de antioxidantes durante o exercício físico deve ser ponderado cuidadosamente, uma vez que as ERO produzidas durante o exercício desempenham um papel essencial nas vias de sinalização responsáveis por adaptações musculares benéficas, como a biogênese mitocondrial, aumento da capacidade antioxidante endógena e melhora da sensibilidade à insulina⁸⁷. Embora a suplementação antioxidante possa atenuar o estresse oxidativo, há evidências de que ela pode interferir negativamente nas adaptações musculares, como a hipertrofia induzida pelo treinamento de força e a biogênese mitocondrial, ao reduzir o sinal mediado pelas ERO⁸⁸. Contudo, vale ressaltar que a maior parte das evidências com impacto negativo robusto provém de estudos em modelos animais, sendo os resultados observados em humanos mais controversos e dependentes de fatores como dose, duração, tipo e intensidade do exercício, além de características individuais^{87,88}.

3.6.2 Homeostase do cálcio e regulação do metabolismo ósseo

O cálcio exerce papel relevante na integridade estrutural e funcional do tecido ósseo, participando diretamente da regulação da remodelação óssea em condições fisiológicas e em resposta a alterações metabólicas transitórias ou crônicas²⁴. Mudanças na concentração sérica de cálcio ionizado (iCa) induzem respostas hormonais, principalmente mediadas pelo PTH, com impacto direto sobre as células ósseas, especialmente osteoclastos^{89,90}.

O exercício físico agudo é amplamente utilizado como modelo experimental para investigar a resposta rápida da homeostase de cálcio^{26,91,92}. Protocolos de alta intensidade frequentemente resultam em reduções transitórias do iCa sérico, acompanhadas por rápida elevação dos níveis circulantes de PTH^{17,26,90}. Esse aumento do PTH pode estimular a mobilização imediata de cálcio a partir do fluido extracelular e ativar a reabsorção óssea por osteoclastos, restaurando rapidamente os níveis adequados de cálcio sérico.

Diversos estudos têm investigado o impacto do exercício intenso sobre essas respostas fisiológicas. Kohrt e colaboradores (2018) observaram redução significativa no iCa sérico e aumento concomitante nos níveis plasmáticos de PTH e β -CTX-I após 60 minutos de ciclismo vigoroso (80% da frequência cardíaca máxima, FCmax)¹⁷. Por outro lado, quando

esses autores mantiveram estáveis os níveis séricos de iCa por meio de infusão intravenosa de cálcio, houve significativa atenuação das respostas do PTH e β -CTX-I. Ainda assim, essas respostas não foram totalmente suprimidas, sugerindo que fatores adicionais além da simples redução do iCa possam contribuir para ativar a reabsorção óssea induzida pelo exercício. Os autores também destacam que o marcador β -CTX-I permaneceu elevado por até quatro horas após o exercício, mesmo após normalização dos níveis de PTH, indicando uma resposta osteoclástica prolongada e independente da recuperação imediata do cálcio sérico.

Achados semelhantes foram descritos por Barry e colaboradores (2011), que investigaram o impacto da suplementação oral de cálcio (1000 mg) antes ou durante um contrarrelógio de ciclismo de 35 km em atletas masculinos²⁶. Nesse estudo, a suplementação antes do exercício conseguiu atenuar significativamente o aumento de PTH comparado ao placebo, porém, não apresentou impacto significativo sobre a elevação imediata do marcador de reabsorção óssea β -CTX-I.

Esses resultados reforçam a hipótese de que, embora a suplementação de cálcio possa atenuar a resposta hormonal inicial mediada pelo PTH, outros fatores metabólicos induzidos pelo exercício contribuem para a ativação da reabsorção óssea. Dentre esses, destaca-se a possível influência de alterações no equilíbrio ácido-base, uma vez que variações no pH sanguíneo são frequentemente observadas durante exercícios intensos^{74,93,94}. No entanto, a magnitude e o papel específico dessas alterações sobre a remodelação óssea aguda ainda não estão completamente estabelecidos, o que justifica a investigação proposta neste estudo.

3.6.3 O impacto das alterações de pH no metabolismo ósseo

O pH é um regulador crítico do metabolismo ósseo, influenciando diretamente os processos de formação e reabsorção óssea^{3,7}. O sangue humano possui um pH fisiológico de 7.34 a 7.45, mantido por mecanismos homeostáticos rigorosos que incluem os sistemas tampão, a função respiratória e a excreção renal de ácidos^{20,95}. Alterações nesse equilíbrio, como em estados de acidose metabólica – caracterizados pelo aumento da concentração de íons hidrogênio (H^+) e redução dos níveis de bicarbonato (HCO_3^-) – induz a liberação de componentes minerais do osso, especialmente íons carbonato e fosfato, que ajudam a neutralizar o excesso de H^+ no meio extracelular^{3,7}. Inicialmente, essa liberação ocorre por meio

da dissolução físico-química da hidroxiapatita^{95,96}. Com a persistência do estímulo, são ativadas respostas celulares que aumentam a reabsorção óssea por osteoclastos e reduzem a atividade formadora dos osteoblastos. Esse padrão é específico da acidose metabólica, como será aprofundado a seguir; na acidose respiratória, a elevação compensatória de bicarbonato tende a reduzir a necessidade de tamponamento ósseo⁹⁶.

3.6.3.1 Efeitos do pH sobre osteoclastos e osteoblastos

A atividade das células ósseas é sensível a pequenas variações no pH dos fluidos intersticiais. Em modelos *in vitro*, osteoclastos expostos a ambientes mais ácidos (na faixa de pH 7.0) apresentam aumento na atividade de reabsorção óssea, enquanto valores mais alcalinos (pH $\geq$ 7.4) tendem a inibir essa função⁷. Esse efeito pode estar associado à ativação de sensores de prótons na membrana celular de osteoclastos, como o canal TRPV1, envolvido na detecção de variações de pH⁷. Além desse efeito direto, a acidose extracelular estimula osteoblastos e osteócitos a produzirem mediadores osteoclastogênicos, como a prostaglandina E₂ (PGE₂) e o RANKL, promovendo a diferenciação e ativação de novos osteoclastos⁹⁵.

Paralelamente, ambientes com pH ácido inibem a função dos osteoblastos, cuja atividade é favorecida por um microambiente levemente alcalino, essencial para a mineralização da matriz osteoide⁷. A acidose leva à redução da síntese de colágeno e da expressão de genes relacionados à matriz extracelular, além de diminuir a atividade da fosfatase alcalina tecidual (TNAP), enzima essencial para a deposição mineral^{95,97}. Em um estudo com calvárias de camundongos, Krieger e colaboradores (1992) observaram que a acidose metabólica crônica promoveu uma queda de aproximadamente 20% na síntese de colágeno e na atividade da TNAP, ao mesmo tempo em que aumentou a liberação da enzima beta-glucuronidase (GUSB) pelos osteoclastos, um marcador de reabsorção óssea⁹⁷.

Diferentes mecanismos moleculares têm sido propostos para explicar essas alterações. Um deles envolve a enzima NPP1, cuja expressão foi aproximadamente 2.8 vezes maior em osteoblastos cultivados sob pH ácido (pH 6.9), conforme observado por Orriss e colaboradores (2015)⁹⁸. Esse aumento de NPP1 levou à maior produção de pirofosfato inorgânico (PPi) no meio extracelular – um potente inibidor da mineralização óssea. Como consequência, houve uma redução da disponibilidade de fosfato inorgânico (Pi), limitando a formação de cristais de hidroxiapatita, mesmo na presença de matriz colagênica.

Além disso, o receptor sensível a prótons OGR1, acoplado à proteína G e expresso em osteoblastos, é ativado em condições de acidose⁹⁹. Essa ativação estimula a expressão da enzima COX-2, levando ao aumento na produção de PGE₂ que, por sua vez, favorece a expressão de RANKL e a ativação osteoclástica. Um estudo recente de Han e colaboradores (2012) demonstrou que a proteína RGS16 – reguladora negativa dessa via – tem sua expressão suprimida em ambientes ácidos, o que pode amplificar ainda mais a sinalização mediada por OGR1²². Em conjunto, esses mecanismos – que envolvem a ativação de sensores de H⁺, a regulação de enzimas como NPP1 e TNAP, e a modulação de mediadores como PGE₂ e RANKL – ajudam a explicar, em nível celular e molecular, como a acidose extracelular favorece a reabsorção óssea em detrimento da formação¹⁰⁰.

3.6.3.2 Acidose induzida pelo exercício físico

Durante exercícios físicos intensos, especialmente aqueles com predominância do metabolismo anaeróbio, ocorre acúmulo de prótons no músculo e na corrente sanguínea, resultando em um estado transitório de acidose metabólica⁵³. Em cenários de esforço físico extenuante, o pH sanguíneo pode atingir valores em torno de 7.0 a 7.1, acompanhado por uma queda na concentração plasmática de bicarbonato logo após o esforço¹⁰⁰. Em um estudo conduzido por Nielsen com remadores de elite, incluindo campeões olímpicos, foram observados valores extremos de pH venoso de até 6.74 imediatamente após uma competição, além de concentrações de lactato superiores a 30 mmol·L⁻¹, caracterizando um estado de acidose profunda¹⁰¹.

Street e colaboradores (2001), por sua vez, utilizaram a técnica de microdiálise com corante fluorescente sensível ao pH para mensurar, de forma contínua, o pH intersticial do músculo vasto lateral durante e após cinco minutos de exercício com intensidades progressivas (30, 50 e 70 W)¹⁰⁰. O pH em repouso (7.38 ± 0.02) reduziu-se proporcionalmente à carga de trabalho, atingindo valores médios de até 7.04 e mínimos de 6.93 em alguns participantes. A acidificação intersticial foi mais pronunciada do que aquela observada no sangue venoso femoral, sugerindo que a acidose local nos tecidos ativos é mais intensa do que estimativas feitas a partir de parâmetros sistêmicos¹⁰⁰. Nesse contexto, surge a seguinte questão: *essa acidose transitória seria suficiente para promover alterações mensuráveis no metabolismo ósseo?*

Uma revisão sistemática com metanálise conduzida por Dolan e colaboradores (2022) confirmou que protocolos de exercício agudo, especialmente aqueles com maior volume de trabalho total (resultante da combinação entre duração e intensidade), podem induzir aumentos moderados a elevados nos marcadores de reabsorção óssea, como o β -CTX-I²⁵. A análise incluiu quase cem estudos, totalizando mais de 1500 participantes, e demonstrou que esse efeito é particularmente evidente em exercícios de natureza repetitiva e prolongada, como o ciclismo contínuo. Em contrapartida, os marcadores de formação óssea, como o P1NP, apresentam alterações bem mais sutis e de curta duração.

Os autores sugerem que essas respostas podem ser moduladas por fatores metabólicos, como a acidose transitória induzida pelo exercício, que potencialmente estimula, de forma temporária, a atividade osteoclástica. Em especial, exercícios exaustivos capazes de reduzir o pH sanguíneo para valores próximos ou inferiores a 7.0 reforçam a hipótese de que alterações agudas no equilíbrio ácido-base podem contribuir para flutuações mensuráveis na remodelação óssea. No entanto, a real magnitude da acidemia induzida por exercícios prolongados e seu papel isolado na resposta óssea *in vivo* permanecem incertos. As evidências disponíveis sugerem que essa acidose é, em geral, moderada e rapidamente compensada pelo organismo. Embora o estudo de Scott e colaboradores (2011) não tenha investigado diretamente as variações do pH, seus achados apoiam a ideia de uma resposta transitória: observou-se uma elevação do β -CTX-I logo após o exercício, seguida de redução significativa nas horas subsequentes e retorno aos níveis basais em cerca de 24 horas, indicando um processo pontual de remodelação¹⁰².

Ainda assim, permanece uma lacuna importante: *até que ponto as flutuações de pH induzidas por exercícios prolongados contribuem, de fato, para os aumentos agudos previamente observados nos biomarcadores de reabsorção óssea?* Embora estudos como o de Scott e colaboradores (2011) sugiram que essa resposta é transitória, não está claro se a acidemia desempenha papel determinante nesse processo ou se representa apenas um entre diversos estímulos metabólicos envolvidos – como alterações no cálcio iônico e na liberação hormonal aguda.

4 JUSTIFICATIVA ESPECÍFICA PARA O ESTUDO

A partir dos avanços no entendimento da remodelação óssea, evidências recentes mostram que o exercício prolongado pode induzir aumentos no biomarcador de reabsorção β -CTX-I. Diversas vias metabólicas têm sido propostas para explicar esse achado, mas os mecanismos subjacentes ainda são pouco compreendidos.

Entre os possíveis moduladores, destaca-se a acidose metabólica transitória induzida pelo exercício, cujos efeitos sobre o metabolismo ósseo permanecem inconclusivos em humanos. Diante disso, o presente estudo busca investigar, de forma controlada, se as alterações agudas no pH sanguíneo influenciam os biomarcadores P1NP e β -CTX-I²⁵ após exercício intermitente de longa duração, com ou sem suplementação. A seguir, apresentam-se as previsões e a hipótese principal que fundamentam esta tese:

1. **Previsão 1:** o teste de ciclismo prolongado alterará o equilíbrio ácido-base, com diminuição do pH e aumento do bicarbonato sanguíneo;
2. **Previsão 2:** as alterações no pH e bicarbonato serão amplificadas pela suplementação acidificante (NH_4Cl) e atenuadas pela suplementação alcalina (NaHCO_3), em comparação ao placebo;
3. **Previsão 3:** o biomarcador de reabsorção óssea, β -CTX-I, apresentará aumento em resposta ao teste de ciclismo prolongado;
4. **Hipótese principal:** caso o pH desempenhe um papel modulador no metabolismo ósseo, espera-se que os níveis de β -CTX-I sejam significativamente maiores na condição acidificante e menores na condição alcalina, em comparação ao placebo, após o exercício; o P1NP também será avaliado, embora não se espere alteração significativa na formação óssea.

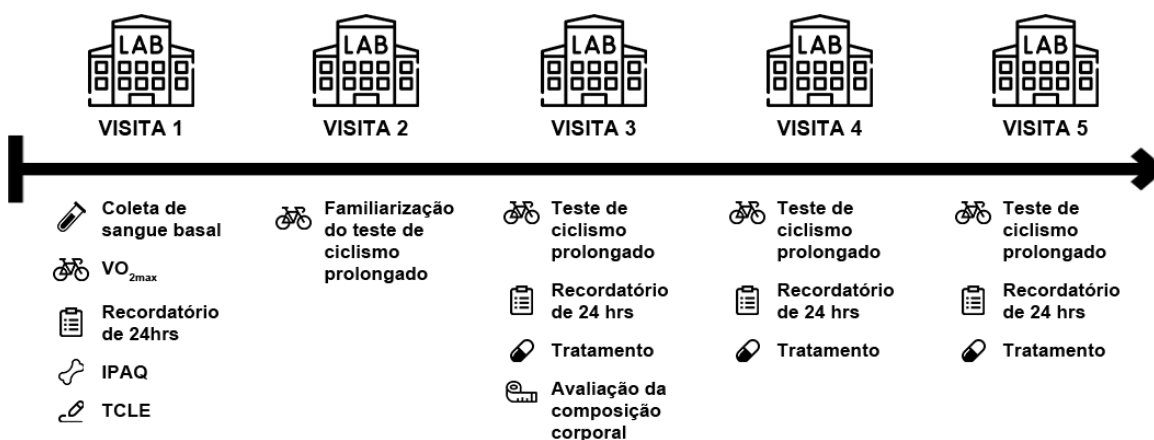
Embora a acidose isolada possa afetar o metabolismo ósseo, optou-se por associá-la ao exercício para simular um estímulo fisiológico multifatorial, que combina oscilações no pH, respostas hormonais e carga mecânica, tornando o estudo mais próximo da realidade esportiva. O β -CTX-I foi selecionado por sua responsividade a alterações agudas, e o P1NP foi incluído para oferecer uma visão integrada da remodelação óssea, permitindo identificar possíveis ajustes concomitantes, mesmo sem expectativa de mudanças relevantes nesse marcador.

5 DESENHO DO ESTUDO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O estudo seguiu um modelo de ensaio clínico randomizado, controlado e cruzado (*cross-over*), com dupla ocultação, para minimizar vieses e assegurar maior confiabilidade nos resultados. O cronograma experimental foi estruturado em cinco visitas ao laboratório, divididas entre a avaliação inicial, familiarização e testes experimentais com suplementação, conforme ilustrado na **Figura 5**.

Os participantes passaram por três condições de suplementação em ordem aleatória: placebo (PLA, amido de milho), agente alcalino (ALC, bicarbonato de sódio) e agente acidificante (AC, cloreto de amônio). As visitas iniciais foram dedicadas à avaliação do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) e à familiarização com o protocolo experimental, visando maior controle e confiabilidade dos resultados obtidos.

Figura 5 – Visão geral do cronograma experimental do estudo



Fonte: elaboração própria.

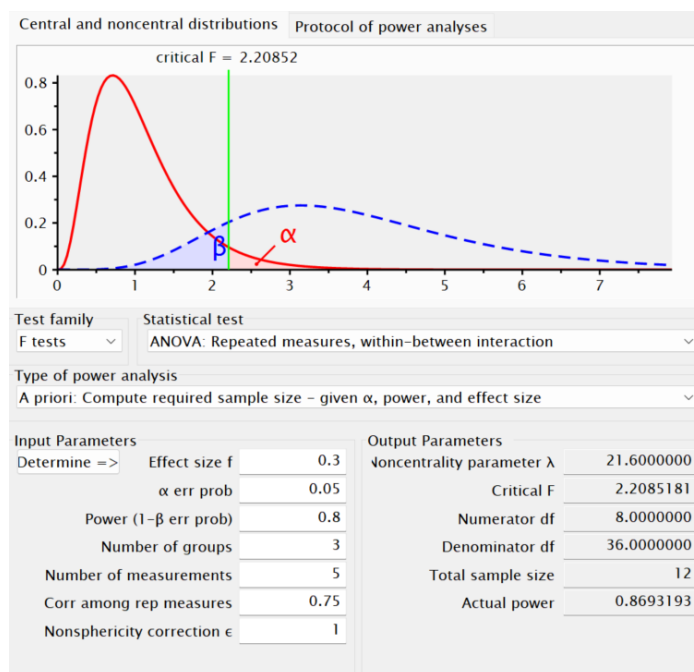
5.1 PARTICIPANTES

O estudo incluiu homens saudáveis, com idade entre 18 e 45 anos. A escolha por participantes exclusivamente do sexo masculino visou reduzir a variabilidade nos resultados, uma vez que os biomarcadores de remodelação óssea apresentam flutuações associadas ao ciclo menstrual em mulheres¹⁰³, o que dificultaria a padronização e a análise dos dados. Os critérios de inclusão foram indivíduos treinados em ciclismo, definidos conforme De Pauw e colaboradores (2013) como aqueles que realizavam treinamento estruturado com volume mínimo de 60 km por semana, garantindo adaptação prévia a esforços prolongados¹⁰⁴. sem

histórico de doenças crônicas que pudessem influenciar as respostas ao exercício e à suplementação. O tamanho da amostra foi calculado com o software G*Power, com base em um modelo de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, com interação entre fatores intra e intergrupos.

Os parâmetros adotados foram: tamanho de efeito $F = 0.3$, classificado como moderado, erro $\alpha = 0.05$ e poder estatístico $(1-\beta)$ de 80%. A análise considerou três condições experimentais (PLA, ALC e AC) e cinco momentos de medição: jejum, pré-teste, durante o teste, pós-teste imediato e duas horas após o término do teste. O resultado indicou que uma amostra de 12 participantes seria suficiente para atingir o poder estatístico necessário, garantindo a identificação de diferenças significativas nos biomarcadores ósseos e minimizando o risco de erro tipo II. A **Figura 6** demonstra as curvas de erro tipo I (α) e erro tipo II (β), além do valor crítico de $F = 2.20852$ obtido na análise.

Figura 6 – Distribuição das curvas de erro tipo I (α) e erro tipo II (β) na análise de poder estatístico para ANOVA de medidas repetidas



Fonte: elaboração própria a partir do software G*Power (versão 3.1.9.7).

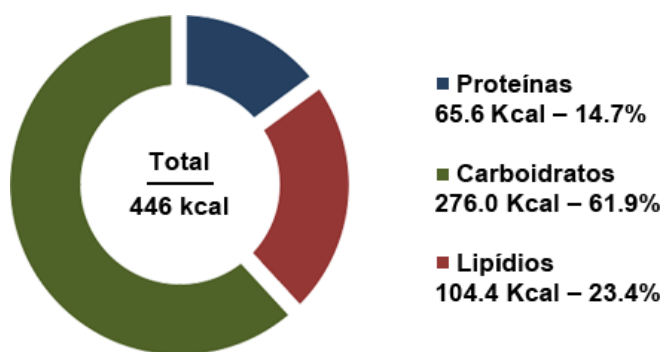
5.2 PERÍODOS DE COLETA DE DADOS

Os BMMs apresentam variações ao longo do dia, influenciadas pelo ritmo circadiano¹⁰⁵. O β -CTX-I, por exemplo, apresenta níveis mais elevados durante a madrugada e

início da manhã, enquanto o P1NP, apesar de também apresentar variações circadianas, tende a ser relativamente mais estável⁵⁹. Essas flutuações podem afetar a interpretação dos resultados, tornando a padronização do horário de coleta um fator essencial para garantir reprodutibilidade e precisão dos dados. Neste estudo, todas as coletas foram iniciadas entre 06:00 e 08:00, assegurando consistência no início da coleta e minimizando o risco de interferência circadiana na análise dos biomarcadores.

Além disso, a ingestão alimentar pode impactar a concentração dos BMMs, especialmente no caso do β -CTX-I, que apresenta uma redução significativa nas horas seguintes à alimentação devido à supressão da atividade osteoclástica⁶⁰. Esse efeito pode dificultar a interpretação dos dados em estudos agudos, tornando necessária a padronização das condições nutricionais antes da coleta⁶⁰. Para minimizar essa influência, o estudo adotou um protocolo de jejum de oito horas seguido de um café da manhã padronizado, garantindo condições homogêneas entre os participantes. O café da manhã fornecido aos mesmos totalizou 446 kcal, com 61.9% de carboidratos, 23.4% de lipídios e 14.7% de proteínas, conforme ilustrado na **Figura 7**.

Figura 7 – Composição calórica e distribuição de macronutrientes do café da manhã oferecido aos participantes



Fonte: elaboração própria.

Tais variações nos BMMs também podem se manifestar de maneira distinta após um estímulo agudo, como o exercício físico²⁵. Estudos indicam que o β -CTX-I exibe aumentos detectáveis ainda nas primeiras horas após o exercício, enquanto o P1NP responde de maneira mais tardia²⁵. No presente estudo, as coletas foram realizadas +1h e +2h após o exercício, priorizando a análise das alterações iniciais na reabsorção óssea.

5.3 VISITAS AO LABORATÓRIO

Em todas as visitas os participantes foram orientados a manter seus hábitos alimentares e de atividade física, evitando o consumo de álcool e exercícios extenuantes nas 48 horas anteriores aos testes. As visitas experimentais foram espaçadas por, no mínimo, sete dias, garantindo recuperação adequada e minimizando efeitos residuais. A ingestão alimentar foi monitorada de forma sistemática por meio de recordatórios de 24 horas, analisados com o software WebDiet®. Essa abordagem permitiu avaliar o consumo energético, a distribuição de macronutrientes e a ingestão de cálcio – nutriente essencial ao metabolismo ósseo²⁴. O objetivo foi identificar variações nutricionais que pudessem interferir nos biomarcadores de remodelação óssea. Para assegurar consistência metabólica ao longo do estudo, os participantes foram orientados a manter uma dieta estável, sem introdução de novos suplementos e evitando o consumo excessivo de álcool.

Além disso, procedimentos operacionais padrão (POPs) foram elaborados para cada etapa do protocolo, garantindo a uniformidade das práticas e minimizando variações técnicas. A equipe foi treinada para fornecer instruções de forma padronizada, especialmente no que se refere às recomendações sobre alimentação e atividade física nos dias que antecediam os testes. Essa padronização teve como objetivo evitar variações comportamentais entre os participantes, contribuindo para a confiabilidade dos dados obtidos. O **Apêndice A** apresenta um exemplo de protocolo e checklist utilizados nas visitas, descrevendo detalhadamente as etapas e os procedimentos seguidos.

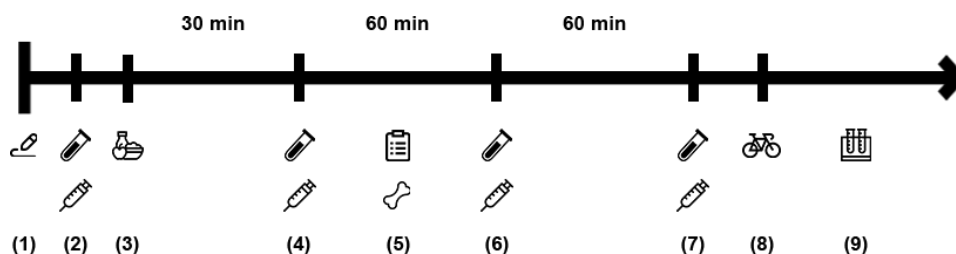
5.3.1 Primeira visita: baseline e teste incremental de VO₂max

A primeira visita teve como objetivo avaliar a variabilidade típica dos biomarcadores em condição de repouso e determinar a capacidade aeróbica dos participantes, com a definição das cargas de trabalho para os testes experimentais subsequentes. Ao chegarem ao laboratório, os participantes realizaram a primeira coleta de sangue, em jejum. Em seguida, foi oferecido um café da manhã padronizado, conforme descrito anteriormente. Após essa refeição, foram realizadas mais três coletas de sangue, nos tempos de 30, 60 e 120 minutos após o café da manhã, com o intuito de avaliar a variação dos biomarcadores na ausência de exercício. Ainda nesta visita, foi realizada a caracterização da atividade física habitual por meio do questionário internacional de atividade física (IPAQ), com o objetivo de registrar o

padrão de exercícios dos participantes e possibilitar maior controle sobre variáveis que poderiam influenciar o metabolismo ósseo. Após o término das coletas, os participantes realizaram o teste incremental de VO_2max no ciclo ergômetro Lode Excalibur®, com o objetivo de avaliar sua capacidade aeróbica e definir as intensidades de trabalho para o teste prolongado de ciclismo. O protocolo teve início com uma carga de 100 W, sendo aumentada em 25 W a cada 3 minutos até a exaustão voluntária ou até que o participante não conseguisse manter uma cadência mínima de 60 rpm.

Durante o teste, foram monitoradas as trocas gasosas por meio do ergoespirômetro K5® e a frequência cardíaca com um monitor peitoral Garmin®. A percepção subjetiva de esforço (PSE) foi registrada ao final de cada estágio, utilizando a escala de Borg, apenas para controle do protocolo, não sendo incluída nas análises estatísticas desta tese. O valor do $\text{VO}_{2\text{pico}}$ foi determinado com base no maior valor de volume de oxigênio (VO_2) registrado em um período de 15 segundos, considerando a ausência de platô na curva de consumo de oxigênio e frequência cardíaca. A **Figura 8** apresenta a sequência dos procedimentos realizados nesta visita.

Figura 8 – Visão geral da primeira visita



(1) Explicação do estudo e entrega do TCLE; (2) Coleta de sangue em jejum; (3) Café da manhã padronizado; (4) Coleta de sangue 30 min após o café da manhã; (5) Aplicação do recordatório alimentar e questionário de atividade física; (6) Coleta de sangue 1h após a segunda coleta; (7) Coleta de sangue 2h após a segunda coleta; (8) Teste incremental de VO_2max ; (9) Centrifugação das amostras. **Fonte:** elaboração própria.

5.3.2 Segunda visita: teste de familiarização

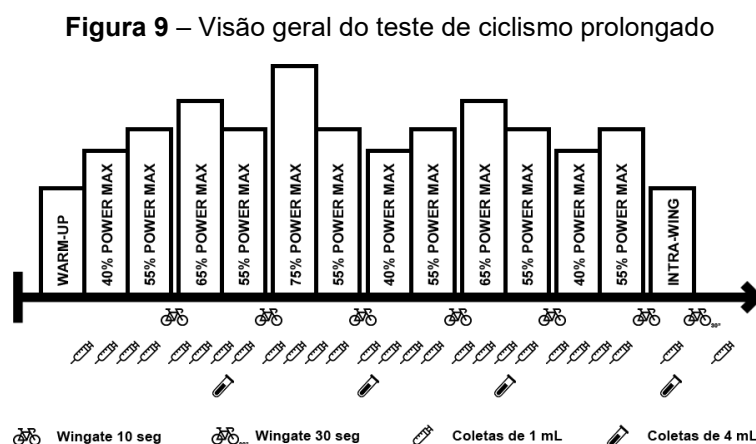
A segunda visita foi planejada com o objetivo de familiarizar os participantes com o protocolo experimental e o manuseio do equipamento, assegurando sua adaptação às condições e exigências do teste prolongado de ciclismo. Essa etapa foi conduzida para minimizar possíveis vieses associados à inexperience e reduzir a variabilidade inter e intraindivi-

dual nos dados coletados, aumentando, assim, a validade e a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, essa visita permitiu a avaliação preliminar da capacidade fisiológica dos participantes em sustentar a intensidade de esforço requerida, possibilitando ajustes necessários para garantir a integridade metodológica da intervenção.

5.3.3 Visitas experimentais: teste de ciclismo prolongado

As três últimas visitas foram dedicadas à aplicação do teste de ciclismo prolongado, conduzido sob as três condições de suplementação (PLA, ALC e AC). O protocolo do teste prolongado tem o intuito de replicar as demandas de uma prova de estrada de ciclismo e foi adaptado do estudo de Perim e colaboradores (2021), com a substituição da relação peso-potência, expressada em watts por quilograma ($\text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$)¹⁰⁶, pela potência máxima (W_{max}) obtida no teste de $\text{VO}_{2\text{max}}$. Esse ajuste metodológico buscou isolar a resposta fisiológica individual ao esforço prolongado, minimizando o impacto das diferenças de composição corporal sobre os resultados e proporcionando uma análise mais precisa das alterações metabólicas relacionadas ao metabolismo ósseo^{107–109}. A ingestão de líquidos durante o teste não foi padronizada, sendo permitida *ad libitum*, de acordo com a necessidade percebida pelo participante.

O teste teve duração de 125 minutos, com intensidades ajustadas em quatro níveis oscilantes de intensidade: 40%, 55%, 65% e 75% da W_{max} . Para simular a dinâmica de uma competição, foram incorporados *sprints* de 10 segundos a cada 19 minutos e 50 segundos, além de um teste de Wingate de 30 segundos ao final, representando o *sprint* conclusivo. A **Figura 9** ilustra a estrutura completa do protocolo, destacando as intensidades, os *sprints* e os momentos de coleta de amostras de sangue.



Fonte: elaboração própria.

A escolha de utilizar o Wmax foi baseada em dois fatores principais. O primeiro refere-se ao controle da variabilidade interindividual, uma vez que o ajuste com base no Wmax elimina o impacto de variações no peso corporal¹¹⁰, permitindo uma avaliação mais precisa da capacidade aeróbica e das respostas metabólicas associadas ao exercício, especialmente no que se refere às alterações de pH e sua influência no metabolismo ósseo. O segundo fator está relacionado à padronização metodológica: a adoção desse parâmetro facilita a comparação com outros estudos da área, que frequentemente utilizam o Wmax como referência, além de garantir uma carga de esforço comparável entre os participantes, independentemente de suas características antropométricas.

5.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE

Durante o teste de ciclismo prolongado, amostras de sangue foram coletadas em intervalos regulares para análise dos biomarcadores de remodelação óssea e dos parâmetros de gasometria. A cada 30 minutos, foram coletados 4 mL de sangue para dosagem dos marcadores β -CTX-I, P1NP e PTH. Paralelamente, amostras com volume inferior a 1 mL foram obtidas a cada 5 minutos para análise de pH, bicarbonato, excesso de base e cálcio ionizado, utilizando o analisador *Stat Profile Prime Plus*® (Nova Biomedical, Waltham, MA, EUA). Essa frequência de coleta permitiu o monitoramento contínuo das alterações no equilíbrio ácido-base, possibilitando a avaliação dos efeitos das diferentes condições de suplementação sobre o ambiente fisiológico durante o exercício.

Com o objetivo de investigar a resposta tardia ao esforço físico e os efeitos da suplementação, conforme detalhado na **Seção 5.2**, amostras adicionais foram obtidas imediatamente após o término do teste, bem como uma e duas horas depois. As amostras de 4 mL foram processadas em até duas horas após a coleta, a fim de preservar a integridade dos biomarcadores. O processamento consistiu em centrifugação padronizada a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, seguida da separação e transferência do soro para tubos identificados. Por fim, as amostras foram armazenadas a -80 °C^{111,112}.

5.5 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO

Os valores dos biomarcadores ósseos β -CTX-I, P1NP e PTH foram corrigidos para alterações no volume plasmático utilizando a equação descrita por Dill e Costill (1974), a qual

permite estimar variações percentuais nos volumes sanguíneos totais, celulares e plasmáticos com base nas concentrações de hemoglobina (Hb) e hematócrito (Hct) antes e após a intervenção¹¹³. Essa abordagem é utilizada para ajustar possíveis alterações na concentração dos biomarcadores decorrentes de variações no volume plasmático induzidas pelo exercício, como contração ou expansão do plasma, assegurando maior precisão na interpretação dos resultados. A aplicação desse método baseia-se na suposição de que o conteúdo de hemoglobina não se altera com o deslocamento de fluidos, permitindo o cálculo da variação de volume plasmático e, conseqüentemente, a correção dos valores observados para uma estimativa mais fidedigna da resposta biológica¹¹³. No entanto, devido à indisponibilidade de dados hematológicos em algumas coletas, a correção pôde ser aplicada apenas a parte das amostras. Por esse motivo, as análises apresentadas na seção de resultados referem-se exclusivamente aos dados completos, sem ajuste para variação do volume plasmático.

5.6 PROTOCOLO DE SUPLEMENTAÇÃO

A dosagem dos suplementos foi definida com base em estudos prévios que demonstraram a eficácia de $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de bicarbonato de sódio para induzir alcalose e $0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de cloreto de amônio para induzir acidose¹¹⁴. Essas quantidades foram selecionadas para provocar alterações significativas no pH sanguíneo, sem causar desconforto excessivo ou riscos à saúde¹¹⁵. Os suplementos foram administrados em cápsulas opacas e indistinguíveis para garantir a dupla ocultação e minimizar o viés na percepção dos participantes, seguindo práticas metodológicas reconhecidas em estudos de manipulação do pH.

Para reduzir o risco de desconforto gastrointestinal associado à ingestão de bicarbonato de sódio ou cloreto de amônio, a administração dos suplementos foi fracionada em quatro doses, com intervalos de 10 minutos entre elas. Esse fracionamento favoreceu a absorção gradual das substâncias e minimizou efeitos adversos, como náuseas e desconforto abdominal. A última dose foi ingerida 30 minutos antes do início do teste de ciclismo prolongado, com base em estudos que indicam o pico de efeito entre 60 e 90 minutos após a ingestão¹¹⁶. Essa estratégia garantiu que os efeitos fisiológicos estivessem ativos durante o exercício.

O cegamento foi adotado para preservar a integridade metodológica do estudo, com a equipe de investigação dividida em dois grupos: investigadores cegos e não cegos. Os investigadores não cegos foram responsáveis pela randomização dos tratamentos e pela

análise das gasometrias, mantendo o conhecimento sobre a suplementação administrada para acompanhar as alterações no pH sanguíneo em tempo real. Por outro lado, os investigadores cegos, que interagiram diretamente com os participantes, não tiveram acesso à identificação das condições de suplementação, assegurando uma condução neutra dos testes e das coletas de dados. O uso desse modelo de cegamento duplo é amplamente reconhecido na literatura por minimizar o viés de observador e garantir que os resultados reflitam os efeitos fisiológicos da suplementação, independentemente de influências psicológicas ou expectativas associadas ao tratamento recebido

5.7 RECRUTAMENTO E SELEÇÃO

O recrutamento dos participantes foi realizado por meio de um formulário online no Google Forms®, no qual os candidatos forneceram informações sobre histórico de saúde, uso de suplementos, prática de atividade física e disponibilidade para participação no estudo. Essa triagem inicial permitiu a identificação dos indivíduos elegíveis e a exclusão dos que não atendiam aos critérios estabelecidos, assegurando padronização e qualidade da amostra. O formulário utilizado, apresentado em formato de tabela, encontra-se no **Apêndice B**.

5.7.1 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram definidos para garantir a consistência e validade dos dados, evitando interferências que pudessem comprometer a análise das respostas fisiológicas ao protocolo experimental. Foram adotados os seguintes critérios:

1. **Suplementação de beta-alanina:** participantes que utilizavam beta-alanina foram excluídos devido ao efeito tamponante de longo prazo dessa substância, que aumenta a concentração de carnosina muscular e neutraliza a acidose intramuscular¹¹⁷. O período de washout da beta-alanina pode durar entre 4 e 16 semanas, o que comprometeria a análise precisa dos efeitos das suplementações alcalina e acidificante.
2. **Uso de creatina:** o uso foi permitido, desde que mantidos a dose e o padrão de consumo habitual. Alterações na ingestão dessa substância poderiam influenciar a capacidade de explosão muscular e a recuperação entre esforços de alta intensidade, introduzindo variabilidade nos resultados.

3. **Suplementos que alteram o equilíbrio ácido-base:** suplementos como bicarbonato de sódio foram permitidos apenas nos dias de teste, conforme o protocolo experimental, para garantir que as respostas observadas resultassem exclusivamente das intervenções aplicadas.
4. **Suplementos que influenciam o metabolismo ósseo:** foram excluídos participantes que consumiam regularmente vitamina D, cálcio, hormônios ou outros compostos que pudessem alterar os biomarcadores de remodelação óssea β -CTX-I e P1NP.
5. **Condições de saúde:** indivíduos com doenças crônicas, como diabetes, hipertensão e doenças renais, foram excluídos, devido ao impacto dessas condições no metabolismo ácido-base e na resposta ao exercício prolongado²⁰.

Por fim, os participantes foram orientados a não iniciar novos suplementos durante o estudo e a manter inalterado o padrão de consumo daqueles já utilizados, como proteínas, aminoácidos e cafeína, preservando a homogeneidade da amostra.

5.8 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

As medições antropométricas foram realizadas por investigadores certificados pela Sociedade Internacional para o Avanço da Cineantropometria (ISAK), cuja certificação assegura a aplicação consistente das técnicas entre as visitas, garantindo a precisão e a comparabilidade dos dados. A estimativa do percentual de gordura corporal (%G) foi realizada utilizando a fórmula de Siri¹¹⁸, por meio da equação:

$$\%G = \frac{496}{D} - 450$$

Para o cálculo da densidade corporal (D), foi aplicada a equação validada por Petroski (1996), desenvolvida para populações brasileiras¹¹⁹. O estudo original de Petroski incluiu 672 indivíduos (281 mulheres e 391 homens) com idades entre 18 e 66 anos, utilizando a pesagem hidrostática como método de referência. Os resultados demonstraram alta precisão, com erros padrões de estimativa (EPE) inferiores a 0.009 g·mL⁻¹, conferindo elevada confiabilidade ao método. A escolha dessa equação justifica-se pela adequação ao perfil da população avaliada e pela sólida base metodológica que a sustenta, garantindo uma análise mais consistente e precisa da composição corporal.

5.9 CLASSIFICAÇÃO DO NÍVEL DE DESEMPENHO

Os participantes foram classificados em níveis de desempenho denominados *Performance Level* (PL), de acordo com a metodologia proposta por De Pauw e colaboradores (2013)¹⁰⁴. Esses níveis categorizam ciclistas em cinco graduações (PL1 a PL5), que abrangem desde indivíduos recreacionais não treinados (PL1) até atletas profissionais de elite (PL5). A classificação considera parâmetros fisiológicos e de treinamento, como potência relativa, VO₂max, volume semanal de treino e experiência no ciclismo.

5.10 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi conduzido em conformidade com os princípios éticos aplicáveis a pesquisas envolvendo seres humanos, tendo sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, conforme o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 17970619.7.0000.0065.

Antes do início dos procedimentos, todos os participantes receberam uma explicação detalhada sobre os objetivos, métodos, potenciais riscos e benefícios associados ao estudo. As orientações foram fornecidas em uma sessão individual, durante a qual todas as dúvidas foram devidamente esclarecidas, assegurando a plena compreensão da pesquisa e a decisão voluntária de participação. Após essas explicações, cada participante assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), formalizando seu consentimento e reconhecendo seu entendimento sobre as condições e implicações do estudo. O TCLE encontra-se disponível no **Apêndice C** deste documento.

Por fim, a pesquisa garantiu o anonimato e a confidencialidade dos dados, seguindo rigorosamente as diretrizes da Declaração de Helsinque e da Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamentam a condução de pesquisas com seres humanos no Brasil^{120,121}.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi estruturada para investigar os efeitos da suplementação e do exercício sobre variáveis fisiológicas e metabólicas ao longo do tempo, incluindo possíveis interações entre condições e momentos avaliados. Antes da aplicação dos modelos, os dados foram verificados quanto à consistência e aos pressupostos estatísticos, como presença

de outliers, homocedasticidade, linearidade e normalidade dos resíduos, com apoio de testes e visualizações apropriadas.

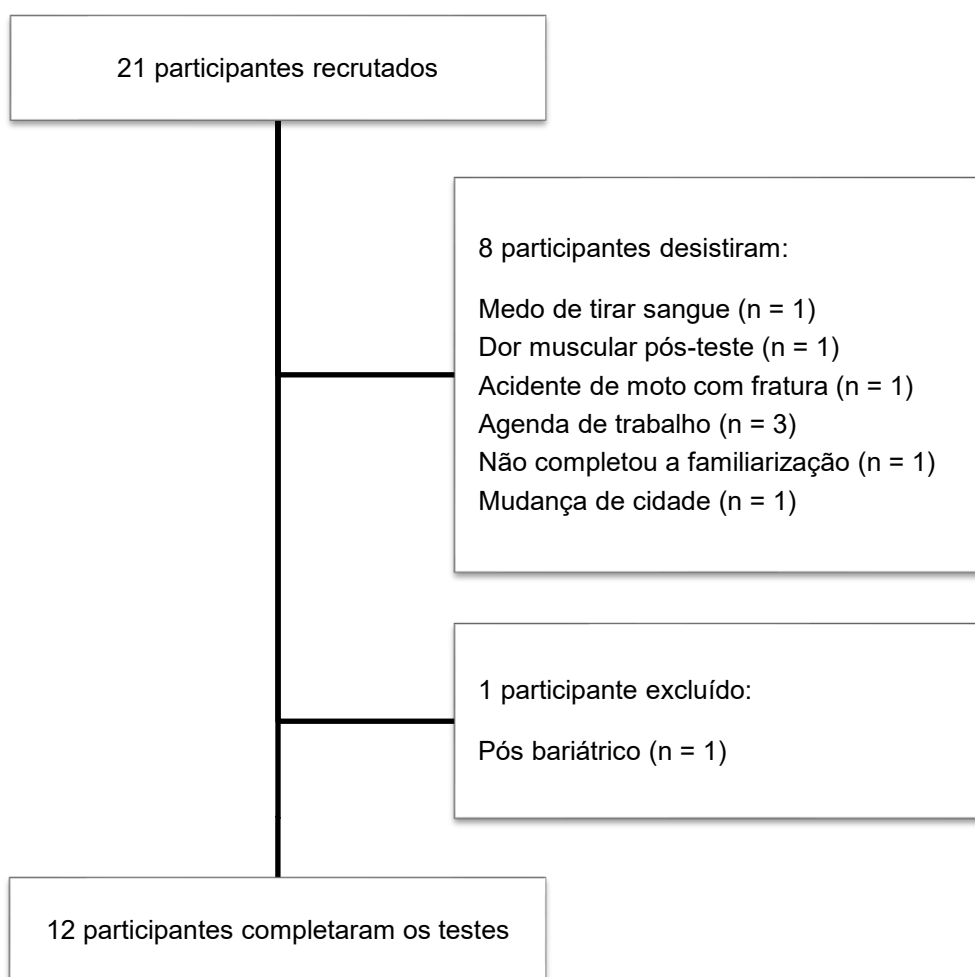
A análise inferencial foi conduzida com modelos lineares mistos. Os efeitos fixos incluíram o tempo de coleta das medidas, a condição de suplementação e a interação entre ambos, enquanto os indivíduos foram modelados como efeitos aleatórios, permitindo acomodar a variabilidade interindividual. Para capturar possíveis padrões não lineares nas respostas ao longo do tempo, utilizou-se uma função baseada em *B-splines* cúbicas, com um nó posicionado no minuto 70, o que garantiu maior flexibilidade na modelagem sem comprometer a generalização dos resultados. A significância estatística dos termos foi avaliada por ANOVA tipo II, com testes F, e, quando apropriado, foram realizadas comparações par-a-par com ajustes pelo método de Hochberg. Todas as análises foram realizadas no software R® (versão 4.2.2; R Core Team®, Vienna, Áustria), com nível de significância de 5%.

Os resultados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão, acompanhados de intervalos de confiança de 95% para cada estimativa e tamanhos de efeito, de forma a refletir tanto a significância estatística quanto a relevância prática dos achados.

6 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

O estudo contou com o recrutamento de 21 participantes, conforme apresentado no fluxograma (**Figura 10**), elaborado de acordo com as diretrizes do *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT). Um participante foi excluído devido a histórico de cirurgia bariátrica, e outros oito desistiram ao longo do processo. Assim, 12 participantes completaram todas as etapas do estudo, incluindo as avaliações do consumo alimentar, dos parâmetros de pH, dos biomarcadores ósseos (β -CTX-I e P1NP) e do desempenho físico.

Figura 10 – Fluxograma do recrutamento, exclusão e participação no estudo



Fonte: elaboração própria.

6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PARTICIPANTES

Os participantes apresentaram características compatíveis com atletas recreacionais bem condicionados. Os valores médios de $\text{VO}_{2\text{pico}}$ ($55.8 \pm 7.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e o percentual

de gordura corporal médio ($18.0 \pm 4.0\%$) estão apresentados na **Tabela 1**. Também foram reportados a massa livre de gordura (MLG) e o índice de massa corporal (IMC). No teste de potência, a potência máxima absoluta média foi de 284.9 ± 29.5 W, enquanto a potência relativa média foi de 3.7 ± 0.4 W·kg⁻¹.

Tabela 1 – Características físicas e de desempenho dos participantes do estudo

Idade (anos)	35.0 ± 8.1
Estatura (m)	1.75 ± 0.05
Massa corporal (kg)	77.1 ± 6.9
Índice de Massa Corporal (kg·m ²)	25.1 ± 1.3
Percentual de Gordura Corporal (%)	$18.0 \pm 4.0^*$
Massa Livre de Gordura (MLG) (kg)	$63.6 \pm 6.7^*$
VO ₂ max (ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	$55.8 \pm 7.2^*$
Potência máxima absoluta (W)	284.9 ± 29.5
Potência máxima relativa (W·kg ⁻¹)	3.7 ± 0.4

Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os valores de percentual de gordura corporal, MLG e VO₂max (indicados com *) foram calculados com base em 11 participantes devido à indisponibilidade dos dados de um dos voluntários. **Fonte:** elaboração própria.

6.1.1 Classificação do nível de desempenho

A distribuição dos participantes entre os níveis de desempenho foi de 72.7% para o grupo PL2 e 27.3% para o grupo PL3. A **Tabela 2** apresenta a categorização dos indivíduos com base na potência máxima (Wmax) absoluta e relativa, bem como o pico de consumo máximo de oxigênio (VO₂pico), expresso em valores absolutos e relativos.

Tabela 2 – Dados e classificação do nível de desempenho dos participantes do estudo

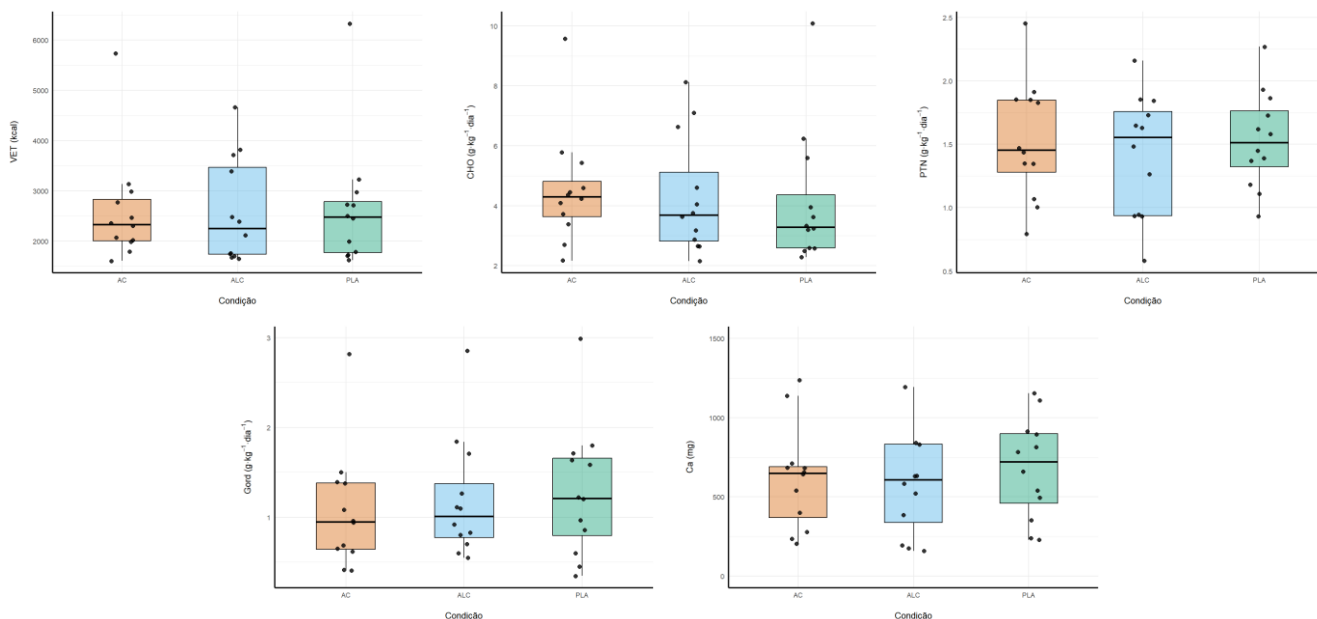
PL	Número de participantes	Wmax Absoluta (W)	Wmax relativa (W·kg ⁻¹)	VO ₂ pico relativo (mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	VO ₂ pico absoluto (mL·min ⁻¹)
PL2	8	301.0 ± 9.7	4.0 ± 0.3	$49.6 \pm 3.4^*$	$4141.1 \pm 427.0^*$
PL3	3	304.0 ± 26.9	3.9 ± 0.6	$60.7 \pm 4.9^*$	$4976.7 \pm 400.1^*$

Os valores VO₂pico relativo e absoluto (indicados com *) foram calculados com base em 11 participantes devido à indisponibilidade dos dados de um dos voluntários. **Fonte:** elaboração própria.

6.1.2 Avaliação do consumo alimentar

Os modelos lineares mistos indicaram ausência de diferenças significativas entre as condições experimentais quanto à ingestão energética total (VET, kcal; $p = 0.96$), carboidratos (CHO, $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$; $p = 0.58$), proteínas (PTN, $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$; $p = 0.57$), gorduras (Gord, $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$; $p = 0.50$) e cálcio (Ca, mg; $p = 0.69$), conforme ilustrado na **Figura 11**.

Figura 11 – Distribuição do consumo alimentar nas diferentes condições de suplementação



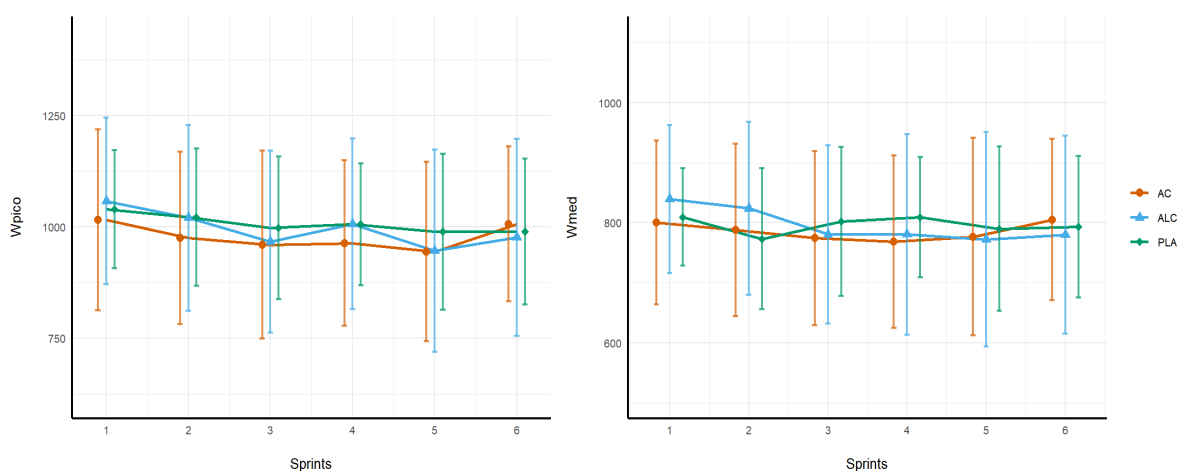
Boxplots representando a ingestão energética (VET), carboidratos (CHO), proteínas (PTN), gorduras (Gord) e cálcio (Ca) nas condições AC (laranja), ALC (azul) e PLA (verde), com os valores individuais sobrepostos. Para o gráfico de cálcio, o eixo Y foi limitado a 1500 mg para melhor representar a tendência central dos dados, apesar da presença de um valor mais alto. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as condições para nenhuma das variáveis ($p > 0.05$; modelos lineares mistos). **Fonte:** elaboração própria.

6.2 PERFORMANCE DURANTE OS TESTES

A análise da *performance* nos *sprints* realizados ao longo do teste de ciclismo prolongado revelou efeito significativo do tempo (*sprint*) sobre a potência de pico ($W_{\max}$; $p < 0.001$), com redução progressiva ao longo das repetições, possivelmente associada à fadiga acumulada. Não foram observados efeitos significativos da condição de suplementação ($p = 0.14$) nem da interação tempo $\times$ suplemento ($p = 0.29$).

Para a potência média (Wmed), também foi observado efeito significativo do tempo ($p = 0.03$), enquanto a condição de suplementação ($p = 0.06$) e a interação tempo $\times$ suplemento ($p = 0.06$) não atingiram significância estatística. Esses resultados estão apresentados na **Figura 12**.

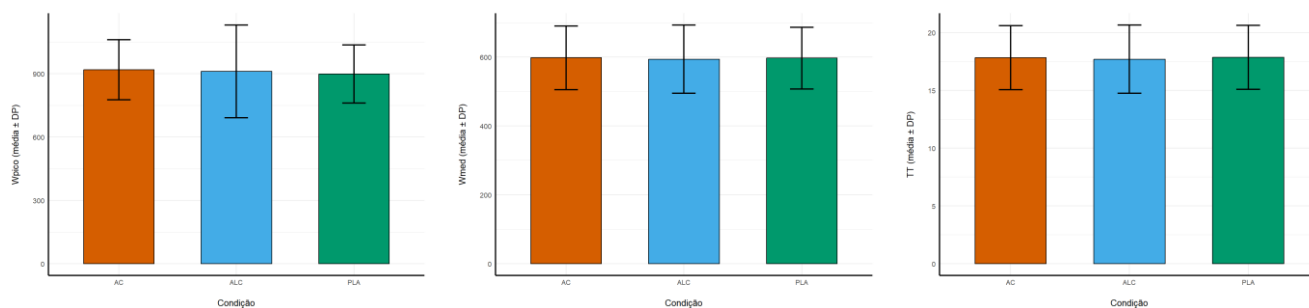
Figura 12 – Evolução da Wpico e Wmed ao longo dos seis sprints nas diferentes condições experimentais



Valores médios $\pm$ desvios-padrão da potência de pico (Wpico, painel esquerdo) e potência média (Wmed, painel direito) ao longo de seis sprints nas condições AC (laranja), ALC (azul) e PLA (verde). Não foram observadas diferenças significativas entre as condições ($p > 0.05$). **Fonte:** elaboração própria.

Além disso, as variáveis de desempenho no teste de Wingate de 30 segundos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as condições de suplementação. Wmax, Wmed e trabalho total (TT) mostraram valores médios semelhantes entre os grupos ($p = 0.71$, $p = 0.93$ e $p = 0.91$, respectivamente), e as comparações pós-hoc corrigidas pelo método de Hochberg confirmaram a ausência de diferenças entre pares de condições ($p > 0.78$). Os resultados estão apresentados na **Figura 13**.

Figura 13 – Desempenho no teste de Wingate de 30 segundos nas diferentes condições



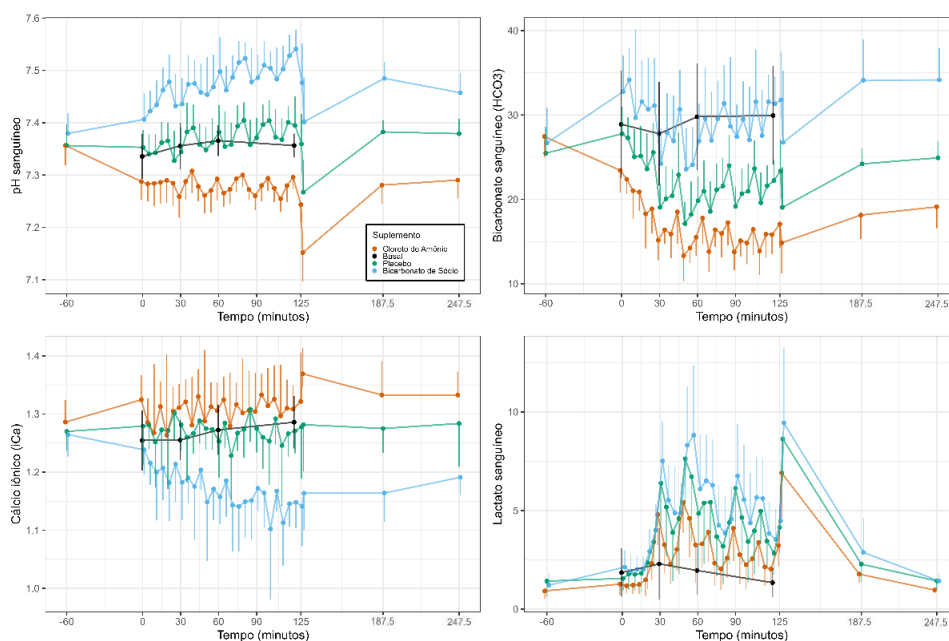
Os gráficos mostram a média $\pm$ desvio-padrão para Wpico, Wmed e trabalho total (TT) nas condições AC (laranja), ALC (azul) e PLA (verde). Não houve diferenças significativas entre as condições ($p > 0.05$). **Fonte:** elaboração própria.

6.3 EFEITO DAS INTERVENÇÕES NO EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE

A **Figura 14** apresenta as médias e os desvios-padrão dos valores de pH sanguíneo, bicarbonato (HCO_3^-), cálcio iônico (iCa) e lactato sanguíneo ao longo do tempo, de acordo com os diferentes suplementos administrados. Devido a falha técnica no analisador de gases, a correção para variações no volume plasmático foi aplicada em 50% das amostras, sem impacto significativo nos resultados; por esse motivo, os dados apresentados referem-se às amostras não corrigidas, de modo a incluir a totalidade das coletas.

Para todos os desfechos analisados, foram observados efeitos estatisticamente significativos do tempo, do tipo de suplemento e da interação entre esses fatores. No pH sanguíneo, os efeitos foram: tempo ($F = 11.91$, $p < 0.0001$), suplemento ($F = 1616.29$, $p < 0.0001$) e interação ($F = 22.39$, $p < 0.0001$). Para o bicarbonato, os valores correspondentes foram: tempo ($F = 66.83$), suplemento ($F = 983.98$) e interação ($F = 13.91$), todos com um $p < 0.0001$. No cálcio ionizado, os efeitos de tempo ($F = 4.87$, $p < 0.001$), suplemento ($F = 632.08$, $p < 0.0001$) e interação ($F = 13.26$, $p < 0.0001$) também se mostraram significativos. Por fim, para o lactato sanguíneo, houve efeito do tempo ($F = 77.39$, $p < 0.0001$), suplemento ($F = 83.47$, $p < 0.0001$) e da interação tempo $\times$ suplemento ($F = 2.76$, $p = 0.005$).

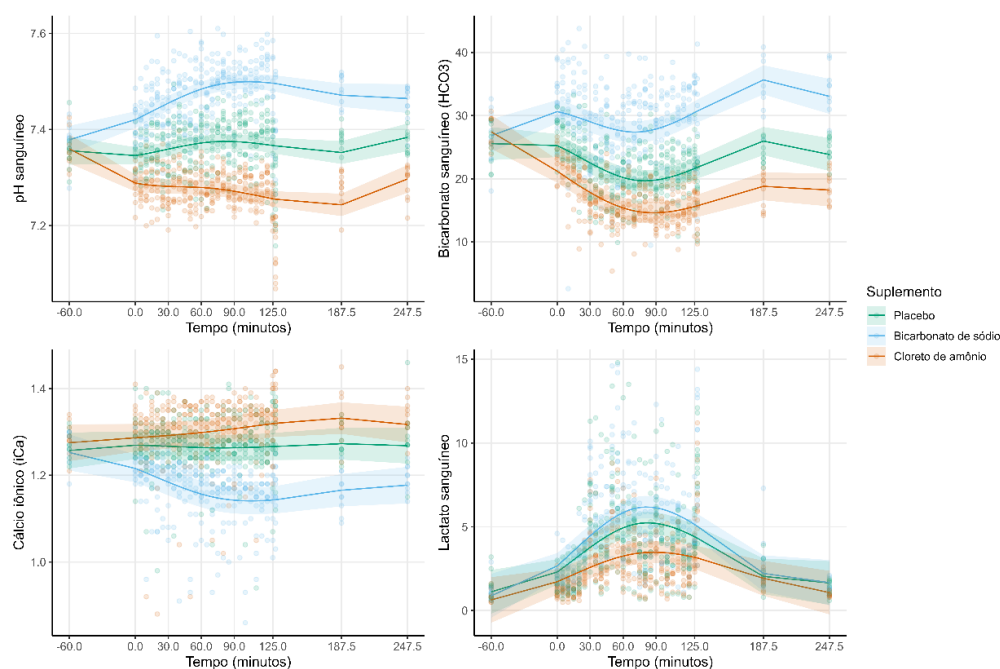
Figura 14 – Variação dos parâmetros sanguíneos ao longo do tempo nas diferentes condições de suplementação



Os gráficos mostram a média $\pm$ desvio-padrão para pH, bicarbonato (HCO_3^-), cálcio iônico (iCa) e lactato sanguíneo durante os testes experimentais. Houve diferenças significativas entre as condições, ao longo do tempo e na interação tempo $\times$ condição ($p < 0.05$). **Fonte:** elaboração própria.

A **Figura 15** apresenta as predições dos modelos lineares mistos para os parâmetros sanguíneos analisados, considerando as três condições de suplementação. Para o pH, os valores estimados diferiram significativamente entre todas as condições a partir do tempo 0, com destaque para as diferenças entre bicarbonato de sódio (ALC) e placebo (PLA) ($\Delta = 0.13$ [0.11; 0.15], $p < 0.001$) e entre cloreto de amônio (AC) e ALC ($\Delta = -0.24$ [-0.26; -0.22], $p < 0.001$) aos 125 minutos. Para o bicarbonato, os valores estimados se distanciaram progressivamente ao longo do tempo, com diferenças significativas em praticamente todos os pontos analisados, sendo a maior observada entre ALC e AC ($\Delta = -15.00$ [-16.76; -13.23], $p < 0.001$) em 127.5 minutos, momento imediatamente após o término do teste. No cálcio iônico, o modelo indicou valores significativamente menores em ALC comparado a PLA e maiores em AC comparado a ambas as condições, com diferenças de até 0.18 mmol/L entre AC e ALC (IC95%: 0.15; 0.20, $p < 0.001$) em 125 minutos. Por fim, para o lactato sanguíneo, observou-se uma elevação progressiva durante o exercício em todas as condições, com valores consistentemente mais baixos na condição AC em comparação às demais. A menor resposta foi evidenciada a partir dos primeiros minutos de esforço, com diferença significativa entre AC e ALC a partir de 10 minutos ($\Delta = -1.25$ [-2.22; -0.28], $p = 0.01$), atingindo até -2.72 mmol/L (IC95%: -3.45; -1.99, $p < 0.001$) em 75 minutos.

Figura 15 – Gráficos de tendência das alterações no pH sanguíneo, bicarbonato sanguíneo (HCO_3^-), cálcio ionizado (iCa) e lactato ao longo do tempo nas diferentes condições

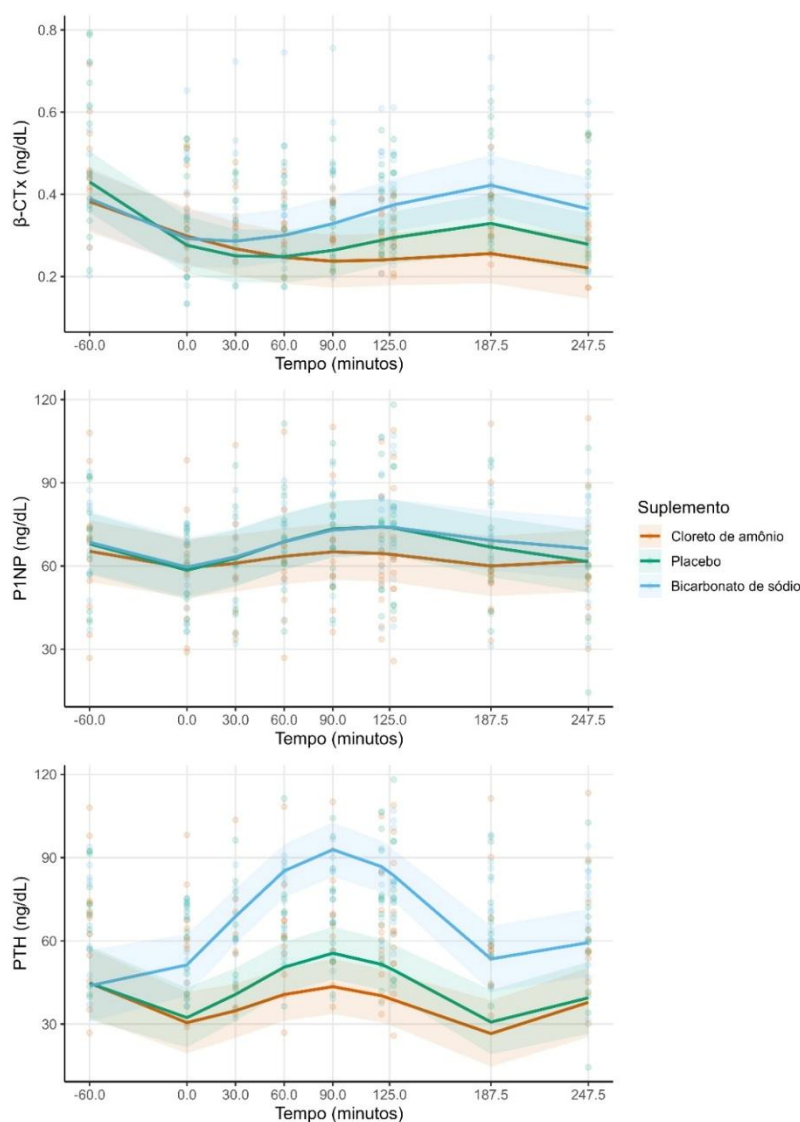


Predições dos modelos para pH, bicarbonato (HCO_3^-), cálcio iônico (iCa) e lactato sanguíneo durante o protocolo experimental. As curvas representam: PLA (verde), ALC (azul) e AC (laranja). As áreas sombreadas indicam o intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** elaboração própria.

6.4 EFEITO DAS INTERVENÇÕES NOS BIOMARCADORES ÓSSEOS

A **Figura 16** apresenta, lado a lado, a variação dos biomarcadores ósseos, β -CTX-I e P1NP, e PTH ao longo do tempo nas três condições experimentais: placebo (PLA), cloreto de amônio (AC) e bicarbonato de sódio (ALC). Os painéis mostram as médias preditas pelos modelos lineares mistos ajustados, acompanhadas dos intervalos de confiança de 95%.

Figura 16 – Variação dos biomarcadores do metabolismo ósseo (β -CTX-I e P1NP) e PTH ao longo do tempo nas diferentes condições de suplementação



Fonte: elaboração própria.

Para o β -CTX-I, os modelos indicaram efeitos significativos ao longo do tempo ($F = 13.66$; $p < 0.0001$), entre os suplementos ($F = 25.15$; $p < 0.0001$) e na interação tempo $\times$

suplemento ($F = 3.22$; $p = 0.002$). Observa-se, por exemplo, que a condição ALC apresentou valores mais elevados nos tempos posteriores, enquanto AC manteve níveis mais baixos ao longo do tempo. Para o P1NP, houve efeito do tempo ($F = 11.36$; $p < 0.0001$) e da condição de suplementação ($F = 10.44$; $p < 0.0001$), sem interação significativa entre tempo $\times$ suplemento ($F = 1.35$; $p = 0.22$), sugerindo que, apesar das variações, as curvas seguiram padrões semelhantes entre as condições.

Na análise dos valores preditos, o modelo identificou diferenças estatisticamente significativas entre as condições para o β -CTX-I em momentos específicos. A partir de 90 minutos, os valores foram consistentemente mais altos com ALC em comparação a AC, com diferenças significativas em 90 min ($\Delta = -0.09$ ng/dL; IC = -0.16 a -0.03), 120 min ($\Delta = -0.12$ ng/dL; IC = -0.18 a -0.07), 127.5 min ($\Delta = -0.13$ ng/dL; IC = -0.19 a -0.07), 187.5 min ($\Delta = -0.17$ ng/dL; IC = -0.26 a -0.07) e 247.5 min ($\Delta = -0.14$ ng/dL; IC = -0.25 a -0.04), todos com $p < 0.05$. Para o P1NP, embora o modelo geral não tenha identificado interação significativa, observou-se que AC apresentou valores significativamente menores em relação a PLA e ALC nos tempos de 90 min ($\Delta = -8.92$ ng/dL; IC = -16.39 a -1.46), 120 min ($\Delta = -9.96$ ng/dL; IC = -16.71 a -3.20) e 127.5 min ($\Delta = -9.94$ ng/dL; IC = -16.71 a -3.18), com $p < 0.05$.

Em relação ao PTH, diferenças significativas foram observadas já no tempo 0, quando ALC apresentou valores mais elevados em comparação a PLA ($\Delta = 18.99$ pg/mL; IC = 1.75 a 36.23) e a AC ($\Delta = -20.81$ pg/mL; IC = -38.52 a -3.10), ambos com $p < 0.05$. Diferenças consistentes entre ALC e AC foram mantidas a partir de 30 min, com maiores concentrações para ALC nos tempos de 30 min ($\Delta = -33.98$ pg/mL; IC = -48.02 a -19.94), 60 min ($\Delta = -44.54$ pg/mL; IC = -57.31 a -31.77), 90 min ($\Delta = -49.38$ pg/mL; IC = -63.38 a -35.38), 120 min ($\Delta = -46.52$ pg/mL; IC = -59.15 a -33.90), 127.5 min ($\Delta = -44.86$ pg/mL; IC = -57.39 a -32.34) e 187.5 min ($\Delta = -26.91$ pg/mL; IC = -47.02 a -6.81), todos com $p < 0.05$. Comparando ALC e PLA, as diferenças também foram significativas nesses mesmos tempos, variando de $\Delta = 28.09$ a $\Delta = 37.34$ pg/mL, enquanto AC não diferiu de PLA na maior parte das coletas.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a manipulação aguda do equilíbrio ácido-base sanguíneo, por meio da suplementação com bicarbonato de sódio (ALC) ou cloreto de amônio (AC), resultou em alterações significativas nos biomarcadores do metabolismo ósseo durante e após exercício prolongado com *sprints* intermitentes em ciclistas treinados. Contrariando a hipótese inicial – *de que a acidose induzida por AC aumentaria os níveis de β -CTX-I e a alcalose induzida por ALC os reduziria* –, a alcalose metabólica esteve associada a um aumento da reabsorção óssea aguda, indicada por maiores concentrações de β -CTX-I, enquanto a acidose metabólica atenuou essa resposta e promoveu leve supressão do marcador de formação óssea (P1NP). Além disso, o PTH apresentou elevação pronunciada sob alcalose e redução sob acidose, acompanhando o padrão observado para o cálcio ionizado e sugerindo um papel mediador desse hormônio nas respostas ósseas ao desafio ácido-base. Apesar das mudanças pronunciadas no estado ácido-base e no metabolismo intermediário, não foram observados efeitos claros sobre o desempenho físico nos protocolos avaliados.

7.1 HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA E CRITÉRIOS DE DESEMPENHO

Os 12 participantes do estudo apresentaram características homogêneas de atletas ciclistas recreacionais bem treinados, conforme planejado no delineamento. A média de $\text{VO}_{2\text{pico}}$ relativa foi de $55.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, valor compatível com o observado em ciclistas amadores treinados. De acordo com a metanálise de Galán-Rioja e colaboradores (2023), que analisou sete estudos com 161 ciclistas treinados (idade média de 32.5 anos), a média de $\text{VO}_{2\text{max}}$ foi de $60.8 \pm 5.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, com valores variando entre aproximadamente 52.0 e $73.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, dependendo do protocolo e nível de condicionamento¹²². Assim, os participantes deste estudo situam-se dentro da faixa esperada para essa população, indicando uma amostra relativamente homogênea em termos de condição física, o que reforça que eventuais diferenças observadas decorreram das intervenções experimentais, e não de disparidades no nível de treinamento.

Para fins de classificação em níveis de performance (PLs), foi adotado o $\text{VO}_{2\text{pico}}$ relativo como critério primário, seguindo a referência de De Pauw e colaboradores (2013)¹⁰⁴

e permitindo comparações diretas com outros estudos. Essa abordagem prioriza a capacidade aeróbica máxima como marcador comparativo entre indivíduos, independentemente de diferenças na massa corporal.

Por outro lado, a potência máxima absoluta (W_{max}) obtida no teste incremental foi utilizada como base para a prescrição e individualização das cargas no teste prolongado. Essa decisão metodológica foi tomada por representar diretamente a carga mecânica total aplicada ao sistema musculoesquelético, variável especialmente relevante em investigações sobre sobrecarga osteomuscular e estímulo ósseo^{107–109}.

Portanto, embora a classificação dos PLs tenha se baseado no VO_{2pico} relativo, a prescrição e individualização das cargas no teste prolongado seguiram a lógica proposta por Perim e colaboradores (2021), com a modificação intencional de substituir a potência relativa pela potência máxima absoluta (W_{max}). Essa adaptação visou minimizar o impacto de variações na composição corporal e garantir maior precisão na análise das respostas fisiológicas ao esforço prolongado, especialmente aquelas relacionadas ao metabolismo ósseo¹⁰⁶.

7.2 ANÁLISE DO CONSUMO ALIMENTAR

A ingestão dietética dos participantes manteve-se consistente entre as condições PLA, ALC e AC, conforme indicado pelos boxplots (**Figura 9**) e pela ausência de diferenças estatisticamente significativas nas variáveis analisadas ($p > 0.49$). As médias de ingestão energética foram de 2605.0 ± 1089.1 kcal (AC), 2594.2 ± 1038.3 kcal (ALC) e 2648.4 ± 1278.2 kcal (PLA). A ingestão de carboidratos foi de 4.54 ± 1.88 , 4.28 ± 1.96 e 4.10 ± 2.25 g·kg⁻¹·dia⁻¹, respectivamente – valores abaixo da recomendação de 6-10 g·kg⁻¹·dia⁻¹ para sessões de 1 a 3 horas de exercício moderado a intenso¹²³. Por outro lado, a ingestão proteica (1.42 - 1.54 g·kg⁻¹·dia⁻¹) esteve dentro do intervalo sugerido para atletas de endurance (1.2 - 2.0 g·kg⁻¹·dia⁻¹), e a ingestão de cálcio variou de 616.9 a 782.4 mg·dia⁻¹, inferior ao recomendado (≥ 1000 mg·dia⁻¹), mas relativamente estável entre as condições.

Importa destacar que a ausência de diferenças significativas entre as condições reforça que a ingestão dietética foi semelhante entre os testes, minimizando o risco de viés nutricional na interpretação dos efeitos ácido-base. Essa uniformidade é metodologicamente relevante, considerando que a baixa disponibilidade de energia, carboidratos ou cálcio pode modular negativamente o metabolismo ósseo frente ao exercício¹²⁴. Assim, os achados do presente estudo podem ser atribuídos com maior confiança às manipulações ácido-base.

7.3 ALTERAÇÕES ÁCIDO-BASE E SUAS INTERAÇÕES COM O CÁLCIO

As intervenções de suplementação foram eficazes em induzir estados contrastantes de alcalose e acidose metabólica, possibilitando a avaliação de suas repercussões fisiológicas. As análises de gasometria e metabólitos sanguíneos confirmaram alterações pronunciadas no equilíbrio ácido-base ao longo do tempo nas diferentes condições ($p < 0.0001$). Especificamente, a ingestão aguda de bicarbonato de sódio elevou o pH sanguíneo em aproximadamente 0.1-0.2 unidades em relação ao placebo. Por outro lado, a ingestão de cloreto de amônio ($0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, condição AC) reduziu o pH em magnitude semelhante. Essas variações são amplamente consideradas fisiologicamente relevantes, dado que alterações de apenas 0.1 unidade de pH já são suficientes para modificar a atividade enzimática e mecanismos regulatórios, incluindo o aumento da fração de iCa e a liberação de PTH, como demonstrado em estudos com humanos durante acidose induzida por exercício ou manipulação laboratorial do pH^{125,126}.

Além da modulação do pH, observou-se um aumento significativo na concentração plasmática de bicarbonato na condição ALC, e uma depleção acentuada na AC, com diferenças superiores a $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ entre os extremos ao final do esforço. Tais alterações superaram amplamente a variabilidade fisiológica basal e estão de acordo com estudos clássicos que descrevem os efeitos sistêmicos de distúrbios ácido-base agudos^{17,126-128}.

Essas alterações no equilíbrio ácido-base também se refletiram diretamente na concentração de cálcio ionizado (iCa). Estudos com humanos demonstraram que a acidose promove aumento do iCa plasmático, enquanto a alcalose reduz seus níveis, devido à maior ligação do Ca^{2+} às proteínas plasmáticas em pH elevado^{17,126}. No presente estudo, cerca de 90 minutos após o início do protocolo, o iCa na condição AC estava aproximadamente $0.18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ acima do valor observado em ALC. Essa diferença foi acompanhada por uma elevação significativa de PTH na condição ALC em relação a AC e PLA, mantida até o final do protocolo, sugerindo que a redução do iCa induzida pela alcalose atuou como gatilho para a resposta do paratormônio. Tal achado é compatível com o que foi descrito por Ljunghall e colaboradores (1985), que demonstraram em humanos a influência da acidose induzida pelo exercício na elevação do iCa em nível regional (sangue da perna exercitada) e sistêmico, com regressão direta entre a queda do pH e o aumento da fração ionizada do cálcio¹²⁵. De forma complementar, os achados de Kohrt e colaboradores (2018) reforçam a relevância funcional dessa modificação: em um estudo com *clamp* de cálcio iônico durante exercício,

os autores mostraram que manter o iCa atenuava, mas não eliminava, o aumento do PTH e do β -CTX-I, sugerindo que o declínio do iCa induzido por alcalose ou exercício vigoroso atua como sinal crítico na ativação do eixo PTH-osso¹⁷.

No que tange ao metabolismo energético, a condição AC apresentou acúmulo significativamente menor de lactato sanguíneo ao longo do exercício, com diferenças detectáveis desde os primeiros minutos. Aos 75 minutos, por exemplo, o lactato médio em AC foi de aproximadamente $3.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, enquanto em ALC foi de $6.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($p < 0.001$). Esse perfil sugere uma modulação do metabolismo em direção a vias mais oxidativas, possivelmente como forma de compensação frente ao ambiente acidótico. Por outro lado, ALC apresentou os maiores valores de lactato, o que está de acordo com a literatura que indica que ambientes alcalinos retardam a inibição da glicólise anaeróbia e favorecem a produção de lactato sob exercício intenso^{106,129}. Essa diferença metabólica, entretanto, não se refletiu em alterações claras no desempenho externo – aspecto que será discutido em maior profundidade na próxima seção.

Importa destacar que o delineamento experimental simula com fidelidade estados fisiológicos agudos semelhantes aos observados em contextos reais de suplementação tamponante em atletas^{115,130}. A magnitude das alterações induzidas, associada à ausência de efeitos adversos limitantes reportados, reforça a efetividade do protocolo de administração – com cápsulas fracionadas e tempo de absorção adequado. Isso garante que os efeitos observados nos desfechos subsequentes, especialmente relacionados ao metabolismo ósseo, ocorreram sob condições bem definidas de alcalemia e acidemia extracelular.

7.4 INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES DE PH NA PRODUÇÃO DE POTÊNCIA

Apesar da manipulação eficaz do pH extracelular pelas intervenções, não foram observadas diferenças de desempenho entre as condições durante os *sprints* repetidos de 10 segundos nem no teste de Wingate de 30 segundos. A alcalose metabólica promoveu elevação significativa e sustentada do pH e do bicarbonato sanguíneo, enquanto a acidose induziu reduções compatíveis com acidemia moderada. Ainda assim, essas alterações não resultaram em efeitos detectáveis sobre a potência gerada ou o trabalho realizado.

A elevação do lactato sanguíneo em todas as condições ($> 8 \text{ mmol/L}$) indica ativação glicolítica relevante e acúmulo de íons H^+ , ou seja, houve acidose sistêmica suficiente para justificar um eventual benefício do tamponamento – o que não se concretizou. Resultados

semelhantes foram observados por Perim e colaboradores (2021), que reportaram ausência de efeito ergogênico da beta-alanina em ciclistas após protocolo prolongado de alta intensidade, mesmo com aumento significativo da carnosina muscular¹⁰⁶. De modo semelhante, Flinn e colaboradores (2014) demonstraram que a alcalose metabólica não atenuou a queda de desempenho sob hipóxia, sugerindo que outros fatores, como a entrega de oxigênio ou o estado de fadiga, podem limitar o benefício do tamponamento¹²⁹. Além disso, a literatura indica que os efeitos ergogênicos do bicarbonato tendem a ser mais consistentes em esforços contínuos de 1 a 10 minutos¹¹⁵, enquanto sua eficácia em *sprints* muito curtos ou sob fadiga acumulada é mais variável e dependente de fatores individuais¹³⁰.

Esse cenário ajuda a contextualizar porque, diferentemente do que foi observado no presente estudo, Dalle e colaboradores (2021) relataram melhora significativa na performance de um *sprint* final de 90 segundos após uma simulação de prova de ciclismo de 3 horas, com protocolo de suplementação escalonada de bicarbonato antes e durante o exercício¹³¹. Essa divergência pode ser parcialmente explicada pela maior duração e continuidade do *sprint* final aplicado por Dalle, potencialmente mais sensível ao tamponamento extracelular do que os *sprints* curtos e intermitentes de 10 segundos utilizados aqui. Mesmo o teste de Wingate, ainda que mais próximo do intervalo ideal de duração (30s), talvez não tenha imposto estresse glicolítico suficientemente alto para gerar um ambiente acidótico no qual o tamponamento externo pudesse exercer efeito ergogênico relevante. Além disso, as intensidades adotadas ao longo do teste de Dalle – variando entre 60% e 90% do limiar de lactato por 3 horas contínuas – resultaram em uma carga metabólica acumulada mais elevada em comparação ao presente protocolo, que teve menor duração total (125 minutos) e incluiu intensidades oscilantes entre 40% e 75% da Wmax. Tais diferenças no perfil de esforço, associadas ao maior tempo sob alcalose induzida pela estratégia escalonada de suplementação, podem ter contribuído para os efeitos positivos observados no estudo de Dalle, enquanto, no presente estudo, a combinação entre menor duração do esforço, menor carga metabólica acumulada e características dos *sprints* testados pode ter limitado a manifestação de qualquer benefício ergogênico associado à alcalose metabólica.

Além disso, é plausível que, mesmo com a elevação sustentada do pH, outros fatores fisiológicos tenham exercido maior influência sobre o desempenho nos *sprints* finais. Por exemplo, é provável que a depleção de fosfocreatina, a fadiga neuromuscular e o volume total de trabalho (~2 horas) tenham se sobreposto aos potenciais efeitos do pH extracelular

elevado. Resultados compatíveis foram reportados por Fiorenza e colaboradores (2019), que compararam dois protocolos de *sprints* intermitentes de alta intensidade com trabalho total equivalente (18×5s vs. 6×20s) e observaram que diferentes mecanismos limitantes emergiram conforme a estrutura do esforço¹³². Enquanto a depleção de PCr teve papel mais relevante na queda de desempenho com *sprints* curtos e pausas curtas, a acidose intramuscular e a fadiga contrátil periférica foram mais pronunciadas com *sprints* mais longos. Assim, os dados aqui apresentados reforçam que, em atletas treinados e sob protocolos complexos, o impacto ergogênico da manipulação do pH sistêmico pode ser limitado, especialmente quando outros fatores fisiológicos críticos já se encontram fortemente comprometidos.

7.5 METABOLISMO ÓSSEO FRENTE À MANIPULAÇÃO ÁCIDO-BASE

Os marcadores de remodelação óssea apresentaram respostas inesperadas às intervenções ácido-base, exigindo uma análise cuidadosa dos mecanismos fisiológicos subjacentes. Contrariando a hipótese inicial, a condição AC não aumentou a reabsorção óssea; ao contrário, foi a condição ALC que resultou nos maiores valores de β -CTX-I ao longo do tempo. A interação tempo $\times$ condição foi significativa para β -CTX-I ($p < 0.01$), com diferenças detectáveis a partir de aproximadamente 90 minutos de protocolo. Aos 120 minutos, por exemplo, o valor médio de β -CTX-I em ALC excedia o de AC em cerca de $0.12 \text{ ng} \cdot \text{dL}^{-1}$, diferença que persistiu até a última coleta, 2 horas após a finalização do teste. Esses resultados indicam que, nas condições testadas, a reabsorção óssea aguda foi mais acentuada sob alcalose, enquanto a acidose foi acompanhada por níveis sistematicamente mais baixos de β -CTX-I.

Essa resposta pode ser interpretada à luz da regulação sistêmica do cálcio. Durante o exercício, a redução do iCa circulante é reconhecidamente um estímulo à secreção de PTH, levando ao aumento subsequente da reabsorção óssea. No presente estudo, a condição ALC não apenas reduziu o iCa, mas também induziu aumentos consistentes de PTH em relação a AC e PLA desde o início do protocolo, mantendo-se elevados até 187,5 min. Essa resposta endócrina acompanhou temporalmente a elevação de β -CTX-I, reforçando o papel do PTH como mediador entre a hipocalcemia relativa e a reabsorção óssea aguda. De fato, Wherry e colaboradores (2021) demonstraram que a redução do iCa durante caminhada intensa aumenta as concentrações de PTH e β -CTX-I em adultos mais velhos, indicando ativação da reabsorção óssea para restabelecer a calcemia⁷⁶. Esses achados são reforçados

por uma metanálise recente conduzida por nosso grupo (Dolan e colaboradores, 2024), a qual confirmou que intervenções com cálcio – seja por infusão, suplemento ou dieta – atenuam o aumento de β -CTX-I induzido pelo exercício, especialmente quando visam mitigar a hipocalcemia induzida pelo esforço¹²⁴. Em linha com nossos dados, estudos de intervenção com bicarbonato de sódio também mostram que essa condição pode reduzir o iCa e aumentar o β -CTX-I, reforçando a ideia de que a hipocalcemia relativa seja um importante gatilho para a reabsorção óssea aguda^{17,26}. Barry e colaboradores (2011), por sua vez, mostraram que a administração de cálcio oral antes do exercício foi capaz de atenuar a elevação de PTH durante 60 minutos de ciclismo, padrão semelhante ao descrito por Kohrt e colaboradores (2018)¹⁷, embora sem efeito claro sobre o β -CTX-I imediato²⁶.

Neste estudo, a condição AC aumentou o iCa circulante (ver **Seção 6.3**), possivelmente suprimindo a secreção de PTH e, potencialmente, estimulando a liberação de calcitonina – hormônio que inibe a atividade osteoclástica – conforme descrito por Androgué e Madias (1998) em modelos clínicos de hipercalcemia^{127,128}. Embora esses mecanismos não tenham sido avaliados diretamente, eles podem explicar a menor reabsorção óssea observada em acidose aguda. Apesar de a acidose metabólica crônica estar frequentemente associada ao aumento da reabsorção óssea^{3,7}, nossos dados sugerem que, em situações agudas, o aumento do iCa atenua esse efeito, com predominância da regulação hormonal sobre a ação direta do pH extracelular. A redução sustentada do pH, embora presente, pode não ter sido suficientemente intensa para estimular diretamente a reabsorção óssea, como observado em modelos *in vitro*. Nesse contexto, a modulação hormonal induzida por alterações no cálcio circulante parece ter desempenhado um papel mais relevante. Esses achados destacam a necessidade de investigar tais mecanismos em modelos humanos integrados, evitando extrapolações diretas de estudos celulares isolados.

Esse cenário é compatível com os achados de Coombs e colaboradores (2025), que verificaram que a ingestão aguda de 1000 mg de cálcio, administrada uma hora antes de exercício militar com carga, elevou o iCa e atenuou de forma acentuada a resposta de PTH e β -CTX-I em mulheres, sugerindo um efeito protetor contra a reabsorção óssea em situações de sobrecarga intensa¹³³. Além disso, tais evidências reforçam a hipótese de que intervenções nutricionais que aumentem ou preservem a calcemia (como suplementação de cálcio) podem modular a reabsorção óssea aguda durante o esforço^{124,133}.

Em relação à formação óssea, o marcador P1NP apresentou respostas discretas, porém consistentes entre as condições experimentais. Observou-se efeito significativo da condição sobre os níveis médios de P1NP ($p < 0.001$), sem interação tempo $\times$ condição. A condição AC apresentou valores médios 9-10 ng·dL⁻¹ inferiores aos das condições PLA e ALC, especialmente entre 90 e 127.5 minutos. Esse resultado sugere uma supressão transitória da atividade osteoblástica sob acidose aguda. Estudos *in vitro* mostram que ambientes ácidos diminuem a síntese osteoblástica de colágeno tipo I^{95,97} (ver **Seção 3.6**), e evidências recentes indicam que a menor disponibilidade de substratos energéticos (*p.e.* carboidratos) também pode contribuir para a redução de P1NP, ao atenuar a liberação de hormônios anabólicos durante o exercício¹²⁴. Assim, a supressão aguda do PTH na condição AC, aliada à menor ativação glicolítica, pode ter contribuído para esse efeito.

De forma coerente, revisões sistemáticas apontam que o β -CTX-I é mais sensível do que o P1NP a intervenções agudas, como variações metabólicas e exercícios de alta intensidade²⁵. No presente estudo, o β -CTX-I apresentou ampla variação em função do estado ácido-base e da calcemia, enquanto o P1NP exibiu alterações modestas e rapidamente reversíveis. Em conjunto, nossos achados sugerem que a manipulação ácido-base aguda modulou o metabolismo ósseo predominantemente por vias endócrinas relacionadas ao iCa, mais do que por efeitos diretos do pH extracelular. A alcalose promoveu maior reabsorção óssea, possivelmente como resposta compensatória à hipocalcemia relativa, ao passo que a acidose suprimiu essa via.

Importante destacar que essas respostas foram observadas em curto prazo. Alterações agudas de pH ou de calcemia podem fazer parte de processos adaptativos e, desde que seguidas de recuperação adequada, não acarretam necessariamente efeitos cumulativos sobre a massa óssea^{65,66}. A metanálise de Dolan e colaboradores (2022) aponta que os marcadores de reabsorção e formação tendem a retornar aos níveis basais em algumas horas, com evidências sugerindo que esse retorno ocorra predominantemente nas primeiras 4 horas, sugerindo uma influência transitória²⁵. Ainda assim, permanece a questão de até que ponto a repetição frequente desses episódios, em treinamentos intensos e de longa duração, poderia influenciar o balanço ósseo no longo prazo – sendo necessárias novas investigações para elucidar possíveis impactos cumulativos em populações específicas, como idosos, atletas de elite ou indivíduos com baixa densidade óssea prévia.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Alguns aspectos metodológicos e amostrais devem ser considerados na interpretação dos resultados, pois podem influenciar a generalização e a força das conclusões. Esses pontos incluem:

- **Tamanho e perfil amostral:** a amostra foi pequena ($n = 12$) e composta exclusivamente por homens jovens a meia-idade, ciclistas recreacionais e treinados. Esses fatores restringem a generalização dos achados para mulheres (especialmente pela influência do ciclo menstrual nos BMMs), idosos, atletas de elite, praticantes de outras modalidades e populações clínicas;
- **Janela temporal curta:** o desenho concentrou-se na resposta aguda (durante o exercício e até 2h após), com ênfase em biomarcadores séricos (β -CTX-I, P1NP, PTH). A ausência de medidas estruturais (p.e., DXA, HR-pQCT) e de seguimento tardio impede inferências sobre impacto crônico na massa e microarquitetura óssea;
- **Intensidade relativa ao Wmax versus limiares fisiológicos:** a prescrição da intensidade foi baseada no Wmax obtido no teste incremental, visando padronização e comparabilidade com estudos prévios. Não foram determinadas intensidades relativas a limiares fisiológicos (ventilatório ou de lactato), abordagem que poderia fornecer informações adicionais, mas que não estava prevista no delineamento original e não foi incluída nas análises.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados deste estudo demonstraram que a manipulação aguda do pH sanguíneo induz alterações significativas nos biomarcadores do metabolismo ósseo, com destaque para o aumento da reabsorção sob alcalose. A partir desses achados, duas direções principais de investigação futura são propostas:

1. **Compreensão do papel do pH extracelular como modulador agudo da remodelação óssea:** a alcalose metabólica elevou significativamente os níveis de β -CTX-I, enquanto a acidose promoveu sua redução, evidenciando que o pH atua como sinal fisiológico capaz de alterar a reabsorção óssea em curto prazo. A investigação mais aprofundada dos mecanismos envolvidos – incluindo a interação com o cálcio iônico, o PTH e a calcitonina – poderá esclarecer de que forma alterações transitórias no pH extracelular, como as induzidas por exercício ou suplementação, impactam a dinâmica do tecido ósseo em humanos;
2. **Avaliação dos efeitos acumulativos da manipulação ácido-base em contextos prolongados:** embora os efeitos observados tenham sido agudos, o potencial impacto cumulativo da exposição frequente a episódios de acidose ou alcalose – como ocorre em regimes de treinamento intensos – permanece incerto. Estudos longitudinais que integrem marcadores bioquímicos, medidas de densidade mineral óssea e avaliação da microarquitetura poderão determinar se essas perturbações fisiológicas, quando recorrentes, representam risco ou oportunidade de adaptação para a saúde óssea em populações vulneráveis ou atletas.

Essas direções futuras partem de evidências experimentais controladas e podem contribuir para o avanço do conhecimento sobre a interação entre equilíbrio ácido-base, exercício físico e metabolismo ósseo.

CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que a manipulação aguda do pH sanguíneo, por meio de suplementação alcalina (bicarbonato de sódio) ou acidificante (cloreto de amônio), exerceu influência nos biomarcadores do metabolismo ósseo durante e após um protocolo de ciclismo prolongado com *sprints* intermitentes em ciclistas recreacionais bem condicionados. De maneira específica, verificou-se que o estado de alcalose metabólica (ALC) reduziu a concentração de iCa e resultou em maiores valores de β -CTX-I ao longo do tempo, sugerindo, assim, um aumento da reabsorção óssea em resposta à menor disponibilidade de cálcio livre na circulação. Em contrapartida, a acidose metabólica (AC) elevou o iCa e esteve associada a níveis significativamente mais baixos de β -CTX, o que sugere um mecanismo compensatório capaz de atenuar a mobilização óssea aguda, possivelmente mediado por menor secreção de PTH.

Além disso, ainda que a alcalose tenha favorecido maiores concentrações sanguíneas de lactato, não se observaram diferenças estatisticamente significativas no desempenho de *sprints* repetidos ou no teste de Wingate. Esse achado reforça a hipótese de que, em protocolos mais extensos e sob fadiga acumulada, outros fatores limitantes podem se sobrepor aos prováveis benefícios fisiológicos do tamponamento sistêmico. Além disso, a ingestão dietética estável entre as três condições conferiu maior robustez aos resultados, assegurando que o perfil alimentar não exercesse influência sobre a remodelação óssea.

Em síntese, os achados demonstram que ajustes agudos do pH sanguíneo podem modular a reabsorção e a formação óssea, mediadas sobretudo pelas oscilações no cálcio ionizado e pela sinalização hormonal associada. Embora os efeitos ergogênicos do tamponamento sistêmico não tenham sido evidentes no protocolo empregado, as implicações para a saúde óssea e para a regulação mineral mostram-se relevantes, especialmente em contextos de exercício de alta intensidade e longa duração. Recomenda-se, portanto, a condução de investigações de maior prazo e com populações mais diversas, a fim de avaliar possíveis efeitos cumulativos dessas alterações metabólicas na densidade mineral óssea e no risco de desfechos osteometabólicos. A continuidade desses estudos poderá esclarecer em que medida a manipulação ácido-base, aliada a um controle dietético adequado e a um planejamento otimizado de treinamento, pode contribuir simultaneamente para a proteção do esqueleto e para a manutenção do desempenho em modalidades de *endurance*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morgan EF, Barnes GL, Einhorn TA. The Bone Organ System: Form and Function. In: Robert Marcus, David Feldman, editors. Osteoporosis: Fourth Edition [Internet]. Fourth. Waltham: Academic Press; 2013 [cited 2024 Dec 29]. p. 3–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00001-7>
2. Sommerfeldt D, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal* [Internet]. 2001 May 9 [cited 2024 Dec 27];10(2):S86–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s005860100283>
3. Rosen CJ. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism [Internet]. Eighth. Rose CJ, Bouillon R, Compston JE, Rosen V, editors. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Oxford: American Society for Bone and Mineral Research; 2018 [cited 2024 Dec 29]. 1071 p. Available from: <https://doi.org/10.1002/9781119266594>
4. Rodan GA. Bone homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)* [Internet]. 1998 Nov 10 [cited 2024 Dec 27];95(23):13361–2. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13361>
5. Junqueira LC, José Carneiro. Tecido ósseo. In: *Histologia Básica: Texto e Atlas*. 12^a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 132–47.
6. Çehreli M, Şahin S, Akça K. Role of mechanical environment and implant design on bone tissue differentiation: current knowledge and future contexts. *J Dent* [Internet]. 2004 Feb [cited 2024 Dec 29];32(2):123–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2003.09.003>
7. Arnett TR. Extracellular pH Regulates Bone Cell Function. *J Nutr* [Internet]. 2008 Feb [cited 2024 Dec 28];138(2):415S–418S. Available from: <https://doi.org/10.1093/JN/138.2.415S>
8. Zhang Y, Zhang Y, Mei Y, Zou R, Niu L, Dong S. Reactive Oxygen Species Enlightened Therapeutic Strategy for Oral and Maxillofacial Diseases—Art of Destruction and Reconstruction. *Biomedicines* [Internet]. 2022 Nov 11 [cited 2024 Dec 29];10(11):2905. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112905>
9. Cerani A, Zhou S, Forgetta V, Morris JA, Trajanoska K, Rivadeneira F, et al. Genetic predisposition to increased serum calcium, bone mineral density, and fracture risk in

- individuals with normal calcium levels: mendelian randomisation study. *The BMJ* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 Dec 29];366:1–12. Available from: <https://doi.org/10.1136/BMJ.L4410>
10. Camacho-Cardenosa M, Camacho-Cardenosa A, Timón R, Olcina G, Tomas-Carus P, Brazo-Sayavera J. Can Hypoxic Conditioning Improve Bone Metabolism? A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2019 May 21 [cited 2024 Dec 29];16(10):1799. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph16101799>
 11. Ng CA, Gandham A, Mesinovic J, Owen PJ, Ebeling PR, Scott D. Effects of Moderate-to High-Impact Exercise Training on Bone Structure Across the Lifespan: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Bone and Mineral Research* [Internet]. 2023 Nov 1 [cited 2024 Dec 29];38(11):1612–34. Available from: <https://dx.doi.org/10.1002/jbmr.4899>
 12. Marini S, Barone G, Masini A, Dallolio L, Bragonzoni L, Longobucco Y, et al. The Effect of Physical Activity on Bone Biomarkers in People With Osteoporosis: A Systematic Review. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2020 Oct 22 [cited 2024 Dec 29];11:1–11. Available from: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.585689>
 13. Shu Z, Jung M, Beger HG, Marzinzig M, Han F, Butzer U, et al. pH-dependent changes of nitric oxide, peroxynitrite, and reactive oxygen species in hepatocellular damage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 1997 [cited 2025 Jan 17];273(5 36-5). Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.1997.273.5.G1118>
 14. De Sousa CV, Sales MM, Rosa TS, Lewis JE, de Andrade RV, Simões HG. The Anti-oxidant Effect of Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Medicine* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2025 Jan 17];47(2):277–93. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40279-016-0566-1>
 15. Street D, Bangsbo J, Juel C. Interstitial pH in human skeletal muscle during and after dynamic graded exercise. *J Physiol* [Internet]. 2001 Dec 15 [cited 2025 Jan 17];537(Pt 3):993. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2279011/>
 16. Fenton TR, Tough SC, Lyon AW, Eliasziw M, Hanley DA. Causal assessment of dietary acid load and bone disease: A systematic review & meta-analysis applying Hill's epidemiologic criteria for causality. *Nutr J* [Internet]. 2011 Apr 30 [cited 2024 Dec 29];10(41):1–23. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-41>
 17. Kohrt WM, Wherry SJ, Wolfe P, Sherk VD, Wellington T, Swanson CM, et al. Maintenance of Serum Ionized Calcium During Exercise Attenuates Parathyroid Hormone and

- Bone Resorption Responses. *Journal of Bone and Mineral Research* [Internet]. 2018 Apr 18 [cited 2024 Dec 29];33(7):1326–34. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3428>
18. Chen W, Abramowitz MK. Metabolic acidosis and the progression of chronic kidney disease. *BMC Nephrol* [Internet]. 2014 Apr 3 [cited 2025 Aug 9];15(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2369-15-55>
 19. Gokel Y, Paydas S, Koseoglu Z, Alparslan N, Seydaoglu G. Comparison of Blood Gas and Acid-Base Measurements in Arterial and Venous Blood Samples in Patients with Uremic Acidosis and Diabetic Ketoacidosis in the Emergency Room. *Am J Nephrol* [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2025 Aug 9];20(4):319–23. Available from: <https://dx.doi.org/10.1159/000013607>
 20. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what’s changed and why it matters. *Kidney Int* [Internet]. 2017 Jul [cited 2025 Feb 22];92(1):26–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.04.006>
 21. Cairns SP, Lindinger MI. Lactic acidosis: implications for human exercise performance. *European Journal of Applied Physiology* 2025 125:7 [Internet]. 2025 Mar 15 [cited 2025 Aug 9];125(7):1761–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00421-025-05750-0>
 22. Han Y, An M, Yang L, Li L, Rao S, Cheng Y. Effect of Acid or Base Interventions on Bone Health: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression. *Advances in Nutrition* [Internet]. 2021 Jul [cited 2024 Dec 29];12:1540–57. Available from: <https://doi.org/10.1093/advances/nmab002>
 23. Haakonssen EC, Ross ML, Knight EJ, Cato LE, Nana A, Wluka AE, et al. The Effects of a Calcium-Rich Pre-Exercise Meal on Biomarkers of Calcium Homeostasis in Competitive Female Cyclists: A Randomised Crossover Trial. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 13 [cited 2024 Nov 8];10(5):e0123302. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0123302>
 24. Cashman KD. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *British Journal of Nutrition* [Internet]. 2007 Mar 9 [cited 2024 Nov 8];87(S2):S169–77. Available from: <http://doi.org/10.1079/BJN/2002534>
 25. Dolan E, Dumas A, Keane KM, Bestetti G, Freitas LHM, Gualano B, et al. The Bone Biomarker Response to an Acute Bout of Exercise: A Systematic Review with Meta-

- Analysis. *Sports Medicine* [Internet]. 2022 Jul 23 [cited 2022 Nov 19];52:2889–908. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40279-022-01718-8>
26. Barry DW, Hansen KC, Van Pelt RE, Witten M, Wolfe P, Kohrt WM. Acute Calcium Ingestion Attenuates Exercise-induced Disruption of Calcium Homeostasis. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2011 Apr [cited 2024 Dec 29];43(4):617–23. Available from: <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181f79fa8>
 27. Hilkens L, Van Schijndel N, Weijer V, Boerboom M, Van Der Burg E, Peters V, et al. Low Bone Mineral Density and Associated Risk Factors in Elite Cyclists at Different Stages of a Professional Cycling Career. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2024 Nov 8];55(5):957–65. Available from: https://journals.lww.com/acsm-msse/fulltext/2023/05000/low_bone_mineral_density_and_associated_risk.20.aspx
 28. Tai V, Leung W, Grey A, Reid IR, Bolland MJ. Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis. *The BMJ* [Internet]. 2015 Sep 29 [cited 2024 Dec 29];351:1–14. Available from: <https://www.bmj.com/content/351/bmj.h4183>
 29. Zhou R, Guo Q, Xiao Y, Guo Q, Huang Y, Li C, et al. Endocrine role of bone in the regulation of energy metabolism. *Bone Research* 2021 9:1 [Internet]. 2021 May 20 [cited 2025 Feb 7];9(1):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00142-4>
 30. Zhang K, Liu X, Wang L, Liu Z, Yi Q, Geng B, et al. The mechanosensory and mechanotransductive processes mediated by ion channels and the impact on bone metabolism: A systematic review. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2021 Aug 27 [cited 2024 Dec 25];711:1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109020>
 31. Oldknow KJ, MacRae VE, Farquharson C. Endocrine role of bone: recent and emerging perspectives beyond osteocalcin. *Journal of Endocrinology* [Internet]. 2015 Apr [cited 2024 Dec 25];225(1):R1–19. Available from: <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0584>
 32. López I, Aguilera-Tejero E, Rodríguez M, Estepa JC, Felsenfeld AJ. Role of acidosis-induced increases in calcium on PTH secretion in acute metabolic and respiratory acidosis in the dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2025 Feb 14];286:E780–5. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00473.2003>
 33. Carmeliet G, Dermauw V, Bouillon R. Vitamin D signaling in calcium and bone homeostasis: A delicate balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2015 Aug [cited 2024 Nov 8];29(4):621–31. Available from: <http://doi.org/10.1016/J.BEEM.2015.06.001>

34. Maïmoun L, Simar D, Caillaud C, Coste O, Barbotte E, Peruchon E, et al. Response of calciotropic hormones and bone turnover to brisk walking according to age and fitness level. *J Sci Med Sport* [Internet]. 2009 Jul [cited 2025 Feb 14];12(4):463–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2008.05.004>
35. Chapurlat RD. Bone microdamage. *Osteoporosis International* [Internet]. 2009 Apr 2 [cited 2024 Dec 25];20(6):1033–5. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0859-4>
36. Rico-González M, Martín-Moya R, Moreno-Villanueva A. Effects of Early-Childhood-Based Interventions Influencing Bones: A Systematic Review. *J Funct Morphol Kinesiol* [Internet]. 2023 Dec 20 [cited 2024 Dec 29];9(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.3390/jfmk9010002>
37. Papastavrou A, Schmidt I, Deng K, Steinmann P. On age-dependent bone remodeling. *J Biomech* [Internet]. 2020 Apr 16 [cited 2024 Dec 25];103:1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2020.109701>
38. Zhang YY, Xie N, Sun XD, Nice EC, Liou YC, Huang C, et al. Insights and implications of sexual dimorphism in osteoporosis. *Bone Research* 2023 12:1 [Internet]. 2024 Feb 18 [cited 2025 Aug 9];12(1):1–30. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00306-4>
39. Dolan E, Varley I, Ackerman KE, Pereira RMR, Elliott-Sale KJ, Sale C. The Bone Metabolic Response to Exercise and Nutrition. *Exerc Sport Sci Rev* [Internet]. 2020 Apr [cited 2025 Jan 28];48(2):49–58. Available from: <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000215>
40. Gong JK, Arnold JS, Cohn SH. Composition of trabecular and cortical bone. *Anat Rec* [Internet]. 1964 Jul [cited 2024 Dec 29];149(3):325–31. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.1091490303>
41. Legeros RZ, Kijkowska R, Bautista C, Legeros JP. Synergistic effects of magnesium and carbonate on properties of biological and synthetic apatites. *Connect Tissue Res* [Internet]. 2009 Jul 7 [cited 2025 Jan 28];33(1–3):203–9. Available from: <https://doi.org/10.3109/03008209509017003>
42. Stanley ED, Ginsberg MH, Plow EF. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1991 [cited 2025 Jan 28];16(C):246–50. Available from: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90096-E](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90096-E)

43. Rousselle A V., Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* [Internet]. 2002 Apr [cited 2025 Jan 28];30(4):533–40. Available from: [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00672-5](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00672-5)
44. Burr DB, Akkus O. Bone Morphology and Organization. *Basic and Applied Bone Biology* [Internet]. 2014 Jan [cited 2025 Jan 28];3–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00001-0>
45. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 1995 Nov [cited 2024 Dec 27];57:344–58. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00302070>
46. Ma Q, Miri Z, Haugen HJ, Moghanian A, Loca D. Significance of mechanical loading in bone fracture healing, bone regeneration, and vascularization. *J Tissue Eng* [Internet]. 2023 May 22 [cited 2024 Dec 27];14:1–34. Available from: <https://doi.org/10.1177/20417314231172573>
47. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Aug 13 [cited 2025 Feb 2];285(33):25103. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
48. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2020 Oct 20 [cited 2025 Feb 1];39(1):19–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01162-6>
49. Babatunde OO, Forsyth JJ, Gidlow CJ. A meta-analysis of brief high-impact exercises for enhancing bone health in premenopausal women. *Osteoporosis International* [Internet]. 2011 Sep 28 [cited 2024 Dec 29];23:109–19. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00198-011-1801-0>
50. Mann V, Huber C, Kogianni G, Jones D, Noble B. The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* [Internet]. 2006 Oct [cited 2025 Feb 1];6(4):408. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1847464/>
51. Davis HM, Deosthale PJ, Pacheco-Costa R, Essex AL, Atkinson EG, Aref MW, et al. Osteocytic miR21 deficiency improves bone strength independent of sex despite having sex divergent effects on osteocyte viability and bone turnover. *FEBS J* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2025 Feb 1];287(5):941–63. Available from: <https://doi.org/10.1111/febs.15066>

52. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* [Internet]. 2008 Jan 12 [cited 2025 Feb 1];42(4):606–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.12.224>
53. Arnett TR. Acidosis, hypoxia and bone. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2025 Feb 1];503(1):103–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.07.021>
54. E. Wesson D. Metabolic Acidosis Effects on Bone and Its Metabolism. *Metabolic Acidosis* [Internet]. 2016 Apr 9 [cited 2025 Feb 1];111–20. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3463-8_11
55. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFκB ligand and tumor necrosis factor-α in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* [Internet]. 2002 Feb [cited 2025 Feb 2];30(2):340–6. Available from: [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00682-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00682-2)
56. Dvorak MM, Riccardi D. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium* [Internet]. 2004 Mar [cited 2024 Dec 25];35(3):249–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.10.014>
57. Ota K, Quint P, Weivoda MM, Ruan M, Pederson L, Westendorf JJ, et al. Transforming growth factor beta 1 induces CXCL16 and leukemia inhibitory factor expression in osteoclasts to modulate migration of osteoblast progenitors. *Bone* [Internet]. 2013 Nov [cited 2025 Feb 2];57(1):68–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.07.023>
58. Crane JL, Cao X. Function of matrix IGF-1 in coupling bone resorption and formation. *J Mol Med* [Internet]. 2013 Sep 26 [cited 2025 Feb 2];92(2):107–15. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1084-3>
59. Bauer D, Krege J, Lane N, Leary E, Libanati C, Miller P, et al. National Bone Health Alliance Bone Turnover Marker Project: Current practices and the need for US harmonization, standardization, and common reference ranges. *Osteoporosis International* [Internet]. 2012 Jul 14 [cited 2025 Feb 14];23(10):2425–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2049-z>
60. Brown JP. Bone turnover markers: Defining a therapeutic target. *Clin Biochem* [Internet]. 2016 May [cited 2025 Feb 14];49(7–8):527–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.04.001>

61. Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006 Oct 13 [cited 2025 Feb 3];349(1):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.214>
62. Liedert A, Augat P, Ignatius A, Hausser HJ, Claes L. Mechanical regulation of HB-GAM expression in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2004 May 28 [cited 2024 Dec 29];319(3):951–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.087>
63. Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, de Blieck-Hogervorst JMA, Klein-Nulend J. Early activation of the β -catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2025 Feb 3];391(1):364–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.064>
64. Huang C, Ogawa R. Mechanotransduction in bone repair and regeneration. *The FASEB Journal* [Internet]. 2010 May 26 [cited 2025 Feb 3];24(10):3625–32. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.10-157370>
65. Bessa AL, Oliveira VN, Agostini GG, Oliveira RJS, Oliveira ACS, White GE, et al. EXERCISE intensity and recovery: Biomarkers of injury, inflammation, and oxidative stress. *J Strength Cond Res* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2024 Oct 31];30(2):311–9. Available from: https://journals.lww.com/nsca-jscr/fulltext/2016/02000/exercise_intensity_and_recovery__biomarkers_of.3.aspx
66. Mezil YA, Allison D, Kish K, Ditor D, Ward WE, Tsiani E, et al. Response of bone turnover markers and cytokines to high-intensity low-impact exercise. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2015 Jul 4 [cited 2024 Nov 8];47(7):1495–502. Available from: https://journals.lww.com/acsm-msse/fulltext/2015/07000/response_of_bone_turnover_markers_and_cytokines_to.20.aspx
67. Nevill AM, Holder RL, Stewart AD. Do sporting activities convey benefits to bone mass throughout the skeleton? *J Sports Sci* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2025 Feb 8];22(7):645–50. Available from: <https://doi.org/10.1080/02640410310001655769>
68. Entwistle I, Francis P, Hume PA, Hind K. Bone mineral density in retired rugby players: initial findings from the UK Rugby Health project. *Journal of Clinical Densitometry* [Internet]. 2018 Oct [cited 2025 Feb 8];21(4):609. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2018.05.032>

69. Abrahin O, Rodrigues RP, Marçal AC, Alves EAC, Figueiredo RC, Sousa EC de. Nata-
ção e ciclismo não causam efeitos positivos na densidade mineral óssea: uma revisão
sistemática. *Rev Bras Reumatol* [Internet]. 2016 Jul [cited 2025 Feb 8];56(4):345–51.
Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2015.09.010>
70. Frost HM. Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *Anat Rec* [Internet]. 1987
Sep [cited 2025 Feb 8];219(1):1–9. Available from:
<https://doi.org/10.1002/ar.1092190104>
71. Felsenberg D, Runge M. Exercise Programs for Patients with Osteoporosis. In: Orwoll
ES, Bilezikian JP, Vanderschueren D, editors. *Osteoporosis in Men* [Internet]. Second
edition. Elsevier Inc.; 2010 [cited 2025 Feb 8]. p. 635–52. Available from:
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374602-3.00052-3>
72. Hutson MJ, O'Donnell E, Brooke-Wavell K, Sale C, Blagrove RC. Effects of Low Energy
Availability on Bone Health in Endurance Athletes and High-Impact Exercise as A Po-
tential Countermeasure: A Narrative Review. *Sports Medicine* [Internet]. 2020 Dec 21
[cited 2024 Nov 8];51(3):391–403. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40279-020-01396-4>
73. Oliveira TP, Espada MC, Massini DA, Robalo RAM, Almeida TAF, Hernández-Beltrán
V, et al. Effects of Exercise and Sports Intervention and the Involvement Level on the
Mineral Health of Different Bone Sites in the Leg, Hip, and Spine: A Systematic Review
and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2023 Aug 7 [cited 2025
Apr 1];20(15):6537. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph20156537>
74. Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic aci-
dosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2004 Sep [cited 2025 Mar
30];287(3 56-3):R502–16. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00114.2004>
75. Leko MB, Pleić N, Gunjača I, Zemunik T. Environmental Factors That Affect Parathyroid
Hormone and Calcitonin Levels. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol
23, Page 44 [Internet]. 2021 Dec 21 [cited 2025 Apr 1];23(1):44. Available from:
<https://doi.org/10.3390/ijms23010044>
76. Wherry SJ, Blatchford PJ, Swanson CM, Wellington T, Boxer RS, Kohrt WM. Maintain-
ing serum ionized calcium during brisk walking attenuates the increase in bone resorp-
tion in older adults. *Bone* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Feb 14];153:116108. Avail-
able from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116108>

77. Filaire E, Toumi H. Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: Friend or enemy? *Joint Bone Spine* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2025 Feb 14];79(4):341–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.03.007>
78. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants* [Internet]. 2020 Sep 10 [cited 2025 Mar 28];9(9):852. Available from: <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>
79. Gao H, Zhao Y, Zhao L, Wang Z, Yan K, Gao B, et al. The Role of Oxidative Stress in Multiple Exercise-Regulated Bone Homeostasis. *Aging Dis* [Internet]. 2023 Sep 29 [cited 2025 Mar 26];14(5):1555–82. Available from: <https://doi.org/10.14336/AD.2023.0223>
80. Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2002 Apr [cited 2025 Feb 14];318(1–2):145–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00766-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00766-5)
81. Banfi G, Iorio EL, Corsi MM. Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2008 Nov 10 [cited 2025 Feb 14];46(11):1550–5. Available from: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.302>
82. Callaway DA, Jiang JX. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2015 Jul 23 [cited 2025 Mar 28];33(4):359–70. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00774-015-0656-4>
83. Kyung TW, Lee JE, Shin HH, Choi HS. Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF- α by inhibiting activation of NF- κ B. *Exp Mol Med* [Internet]. 2008 Feb 29 [cited 2025 Mar 28];40(1):52. Available from: <https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.1.52>
84. Kim HJ, Chang EJ, Kim HM, Lee SB, Kim HD, Su Kim G, et al. Antioxidant α -lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor- κ B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and tumor necrosis factor- α . *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2025 Mar 28];40(9):1483–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.066>
85. Cao JJ, Picklo MJ. N-Acetylcysteine Supplementation Decreases Osteoclast Differentiation and Increases Bone Mass in Mice Fed a High-Fat Diet, . *J Nutr* [Internet]. 2014

- Mar [cited 2025 Mar 28];144(3):289–96. Available from: <https://doi.org/10.3945/jn.113.185397>
86. Choi HK, Kim GJ, Yoo HS, Song DH, Chung KH, Lee KJ, et al. Vitamin C Activates Osteoblastogenesis and Inhibits Osteoclastogenesis via Wnt/?-Catenin/ATF4 Signaling Pathways. *Nutrients* 2019, Vol 11, Page 506 [Internet]. 2019 Feb 27 [cited 2025 Mar 28];11(3):506. Available from: <https://doi.org/10.3390/nu11030506>
 87. Taherkhani S, Valaei K, Arazi H, Suzuki K. An Overview of Physical Exercise and Antioxidant Supplementation Influences on Skeletal Muscle Oxidative Stress. *Antioxidants* [Internet]. 2021 Sep 27 [cited 2025 Mar 29];10(10):1528. Available from: <https://doi.org/10.3390/antiox10101528>
 88. Merry TL, Ristow M. Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? *J Physiol* [Internet]. 2016 Dec 7 [cited 2025 Mar 29];594(18):5135–47. Available from: <https://doi.org/10.1113/JP270654>
 89. Calvi LM, Sims NA, Hunzelman JL, Knight MC, Giovannetti A, Saxton JM, et al. Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone–related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *J Clin Invest* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2025 Mar 29];107(3):277–86. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI11296>
 90. Wherry SJ, Blatchford PJ, Swanson CM, Wellington T, Boxer RS, Kohrt WM. Maintaining serum ionized calcium during brisk walking attenuates the increase in bone resorption in older adults. *Bone* [Internet]. 2021 Dec [cited 2025 Mar 29];153:116108. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116108>
 91. Sherk VD, Barry DW, Hansen KC, Villalon KL, Wolfe P, Johnson S, et al. Effects of calcium and vitamin D supplementation on bone changes in male competitive road cyclists. *The FASEB Journal* [Internet]. 2012 Apr [cited 2024 Nov 8];26(S1):1021.8–1021.8. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fasebj.26.1_supplement.1021.8
 92. Zittermann A, Sabatschus O, Jantzen S, Platen P, Danz A, Stehle P. Evidence for an acute rise of intestinal calcium absorption in response to aerobic exercise. *Eur J Nutr* [Internet]. 2002 Oct [cited 2025 Mar 29];41(5):189–96. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00394-002-0375-1>
 93. Carr AJ, Hopkins WG, Gore CJ. Effects of acute alkalosis and acidosis on performance: A meta-analysis. *Sports Medicine* [Internet]. 2011 Oct 7 [cited 2025 Mar

- 30];41(10):801–14. Available from: <https://doi.org/10.2165/11591440-000000000-00000>
94. Roussel M, Mattei JP, Le Fur Y, Ghattas B, Cozzzone PJ, Bendahan D. Metabolic determinants of the onset of acidosis in exercising human muscle: A 31P-MRS study. *J Appl Physiol* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2025 Mar 30];94(3):1145–52. Available from: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01024.2000>
 95. Bushinsky DA, Krieger NS. The effects of acid on bone. *Kidney Int* [Internet]. 2000 Jun [cited 2025 Feb 14];101(6):1160–70. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.kint.2022.02.032>
 96. Bushinsky DA. Acid-base imbalance and the skeleton. *Eur J Nutr* [Internet]. 2001 Nov [cited 2024 Oct 30];40(5):238–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s394-001-8351-5>
 97. Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 1992 Mar 1 [cited 2025 Mar 30];262(3):F442–8. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1992.262.3.F442>
 98. Orriss IR, Key ML, Hajjawi MOR, Millán JL, Arnett TR. Acidosis Is a key regulator of osteoblast ecto-nucleotidase pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) expression and activity. *J Cell Physiol* [Internet]. 2015 May 29 [cited 2025 Mar 30];230(12):3049–56. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.25041>
 99. Justus CR, Marie MA, Sanderlin EJ, Yang L V. The Roles of Proton-Sensing G-Protein-Coupled Receptors in Inflammation and Cancer. *Genes (Basel)* [Internet]. 2024 Sep 1 [cited 2025 Apr 1];15(9):1151. Available from: <https://doi.org/10.3390/genes15091151>
 100. Street D, Bangsbo J, Juel C. Interstitial pH in human skeletal muscle during and after dynamic graded exercise. *J Physiol* [Internet]. 2001 Dec 15 [cited 2025 Mar 31];537(3):993. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00993.x>
 101. Nielsen HB. pH after competitive rowing: the lower physiological range? *Acta Physiol Scand* [Internet]. 2001 Dec 24 [cited 2025 Mar 31];165(1):113–4. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.1999.00485.x>
 102. Scott JPR, Sale C, Greeves JP, Casey A, Dutton J, Fraser WD. The role of exercise intensity in the bone metabolic response to an acute bout of weight-bearing exercise. *J Appl Physiol* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2025 Mar 31];110(2):423–32. Available from: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00764.2010>

103. Guzman A, Kurgan N, Moniz SC, McCarthy SF, Sale C, Logan-Sprenger H, et al. Menstrual Cycle Related Fluctuations in Circulating Markers of Bone Metabolism at Rest and in Response to Running in Eumenorrheic Females. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2022 Apr 16;111(2):124–36. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00223-022-00970-4>
104. De Pauw K, Roelands B, Cheung SS, De Geus B, Rietjens G, Meeusen R. Guidelines to Classify Subject Groups in Sport-Science Research. *Int J Sports Physiol Perform* [Internet]. 2013 [cited 2025 Jan 24];8(2):111–22. Available from: <https://doi.org/10.1123/ijsp.8.2.111>
105. Gass ML, Kagan R, Kohles JD, Martens MG. Bone turnover marker profile in relation to the menstrual cycle of premenopausal healthy women. *Menopause* [Internet]. 2008 Jul [cited 2025 Feb 14];15(4):667–75. Available from: <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31815f8917>
106. Perim P, Gobbi N, Duarte B, Oliveira LF de, Costa LAR, Sale C, et al. Beta-alanine did not improve high-intensity performance throughout simulated road cycling. *Eur J Sport Sci* [Internet]. 2021 Jun 22 [cited 2024 Dec 29];22(8):1240–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/17461391.2021.1940304>
107. Saunders MJ, Lenzi DN, Luden ND, Kurti SP, Smith KR, Womack CJ. Physiological And Anthropometric Profiles Of Elite Teenage Cyclists In The United States. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2019 Jun [cited 2024 Oct 31];51(6S):811–811. Available from: https://journals.lww.com/acsm-msse/fulltext/2019/06001/physiological_and_anthropometric_profiles_of_elite.2429.aspx
108. Lamberts RP, Lambert MI, Swart J, Noakes TD. Allometric scaling of peak power output accurately predicts time trial performance and maximal oxygen consumption in trained cyclists. *Br J Sports Med* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2024 Oct 31];46(1):36–41. Available from: <https://bjsm.bmj.com/content/46/1/36>
109. Clark B, Macdermid PW. A comparative analysis of critical power models in elite road cyclists. *Curr Res Physiol*. 2021 Jan 1;4:139–44.
110. Bentley DJ, Mcnaughton LR, Thompson D, Vleck VE, Batterham AM. Peak power output, the lactate threshold, and time trial performance in cyclists. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2001 Dec [cited 2025 Feb 22];33(12):2077–81. Available from: <https://doi.org/10.1097/00005768-200112000-00016>

111. Lomeo A, Bolner A. Stability of Several Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Clin Chem* [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2024 Oct 31];46(8):1200–2. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/clinchem/46.8.1200>
112. Zander J, Bruegel M, Kleinhempel A, Becker S, Petros S, Kortz L, et al. Effect of biobanking conditions on short-term stability of biomarkers in human serum and plasma. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2024 Oct 31];52(5):629–39. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2013-0705/html>
113. Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* [Internet]. 1974 Aug [cited 2025 Apr 3];37(2):247–8. Available from: <https://doi.org/10.1152/jappl.1974.37.2.247>
114. Reaich D, Channon SM, Scrimgeour CM, Goodship THJ. Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 1992 Oct 1 [cited 2025 Feb 14];263(4 26-4):E735–9. Available from: <http://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.263.4.e735>
115. Grgic J, Rodriguez RF, Garofolini A, Saunders B, Bishop DJ, Schoenfeld BJ, et al. Effects of Sodium Bicarbonate Supplementation on Muscular Strength and Endurance: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Medicine* [Internet]. 2020 Feb 4;50(7):1361–75. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40279-020-01275-y>
116. Hilton NP, Leach NK, Sparks SA, Gough LA, Craig MM, Deb SK, et al. A Novel Ingestion Strategy for Sodium Bicarbonate Supplementation in a Delayed-Release Form: a Randomised Crossover Study in Trained Males. *Sports Med Open* [Internet]. 2019 Jan 24 [cited 2025 Feb 22];5(1):1–8. Available from: <http://doi.org/10.1186/s40798-019-0177-0>
117. Stellingwerff T, Anwander H, Egger A, Buehler T, Kreis R, Decombaz J, et al. Effect of two beta-alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout. *Amino Acids* [Internet]. 2012 [cited 2025 Feb 22];42:2461–72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1054-4>
118. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. *Nutrition*. 1961 Sep;9(5):480–91.
119. Petroski EL. Desenvolvimento e validação de equações generalizadas para a estimativa da densidade corporal em adultos [Doutorado]. [Santa Maria]: Universidade Federal de Santa Maria; 1995.

120. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 [Internet]. Diário Oficial da União, Seção 1 Brasil: <https://www.gov.br/conselho-nacional-de-saude/pt-br/aceso-a-informacao/legislacao/resolucoes/2012/resolucao-no-466.pdf/view>; 2013. Available from: <https://www.gov.br/conselho-nacional-de-saude/pt-br/aceso-a-informacao/legislacao/resolucoes/2012/resolucao-no-466.pdf/view>
121. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA [Internet]. 2013 Nov 27 [cited 2025 Feb 22];310(20):2191–4. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
122. Galán-Rioja MÁ, Gonzalez-Ravé JM, González-Mohíno F, Seiler S. Training Periodization, Intensity Distribution, and Volume in Trained Cyclists: A Systematic Review. Int J Sports Physiol Perform [Internet]. 2023 Jan 14 [cited 2025 Apr 3];18(2):112–22. Available from: <https://doi.org/10.1123/ijsp.2022-0302>
123. Thomas DT, Erdman KA, Burke LM. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance. J Acad Nutr Diet [Internet]. 2016 Mar [cited 2025 Apr 5];116(3):501–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jand.2015.12.006>
124. Dolan E, Dumas A, Esteves GP, Takarabe LL, Perfeito LAM, Keane KM, et al. The Influence of Nutrition Intervention on the P1NP and CTX-1 Response to an Acute Exercise Bout: A Systematic Review with Meta-Analysis. Sports Medicine [Internet]. 2024 Aug 13 [cited 2024 Nov 7];1–18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40279-024-02087-0>
125. Ljunghall S, Joborn H, Lundin L, Rastad J, Wide L, Åkerström G. Regional and systemic effects of short-term intense muscular work on plasma concentration and content of total and ionized calcium. Eur J Clin Invest [Internet]. 1985 Oct 1 [cited 2025 Apr 5];15(5):248–52. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1985.tb00178.x>
126. Nielsen SP, Christiansen TF, Hartling O, Trap-Jensen J. Increase in Serum Ionized Calcium during Exercise. Clin Sci Mol Med [Internet]. 1977 Dec 1 [cited 2025 Apr 5];53(6):579–86. Available from: <https://doi.org/10.1042/cs0530579>
127. Adrogué HJ, Madias NE. Management of Life-Threatening Acid–Base Disorders - Part 2. New England Journal of Medicine [Internet]. 1998 Jan 8 [cited 2025 Apr 5];338(2):107–11. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJM199801083380207>

128. Adrogué HJ, Madias NE. Management of Life-Threatening Acid–Base Disorders - Part 1. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1998 Jan 8 [cited 2025 Apr 5];338(1):26–34. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJM199801013380106>
129. Flinn S, Herbert K, Graham K, Siegler JC. Differential effect of metabolic alkalosis and hypoxia on high-intensity cycling performance. *J Strength Cond Res* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2025 Apr 5];28(10):2852–8. Available from: <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000489>
130. Heibel AB, Perim PHL, Oliveira LF, McNaughton LR, Saunders B. Time to Optimize Supplementation: Modifying Factors Influencing the Individual Responses to Extracellular Buffering Agents. *Front Nutr* [Internet]. 2018 May 7 [cited 2025 Apr 5];5:362407. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00035>
131. Dalle S, Koppo K, Hespel P. Sodium bicarbonate improves sprint performance in endurance cycling. *J Sci Med Sport* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2025 Apr 20];24(3):301–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2020.09.011>
132. Fiorenza M, Hostrup M, Gunnarsson TP, Shirai Y, Schena F, Iaia FM, et al. Neuromuscular Fatigue and Metabolism during High-Intensity Intermittent Exercise. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2019 Aug [cited 2025 Apr 5];51(8):1642–52. Available from: <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001959>
133. Coombs C V, Greeves JP, Young CD, Irving AS, Eisenhauer A, Kolevica A, et al. The effect of calcium supplementation on bone calcium balance and calcium and bone metabolism during load carriage in women: a randomized controlled crossover trial. *Journal of Bone and Mineral Research* [Internet]. 2025 Jan 13 [cited 2025 Apr 5];00:1–13. Available from: <https://doi.org/10.1093/jbmr/zjaf004>

APÊNDICES

APÊNDICE A – Protocolo e checklist para as visitas ao laboratório

Figura 17 – Protocolo operacional utilizado no teste experimental

PROTOCOLO TESTES EXPERIMENTAIS

Nathália Saffioti Rezende e Eimear Bernadette Dolan

ETAPA 1 – PRÉ-TESTE

1. Se o teste for marcado em um sábado, verifique a necessidade de solicitação de uma autorização com o prof. Hamilton e, caso necessário, realize-a conforme as orientações;
2. Enviar mensagem padrão para o voluntário explicando as recomendações pré-teste dois dias antes da data marcada (editando as partes vermelhas):

Olá, **boa tarde!**

Nosso segundo dia teste está chegando e, por isso, estou novamente aqui para te dar algumas orientações!

1. A primeira é para que amanhã, um dia antes do teste, você evite qualquer mudança brusca de treinamento ou alimentar. Ou seja, não fique longos períodos sem comer; não realize uma refeição pesada e fora da rotina no jantar; não inicie uma nova estratégia de treino nem aumente cargas (para não ficar com dores ou qualquer outra manifestação que possa atrapalhar seu desempenho no teste). Se tiver um treino mais leve que possa fazer amanhã ou não treinar, melhor.

2. Não consuma álcool amanhã.

3. Tenha uma boa noite de sono!

4. No dia do teste, lembre-se: você deve estar em jejum! Amanhã venho te lembrar sobre esse ponto e passar as informações do local.

Obrigada por contribuir com a pesquisa!

3. Enviar mensagem padrão para o voluntário explicando as recomendações pré-teste **um dia antes da data marcada** (verificar orientações específicas da COVID-19 como uso de máscara, vacinação e outros + editar partes em vermelho):

Olá, boa tarde!

Amanhã temos nosso segundo teste!

O local é Av. Professor de Mello Moraes, 65. O laboratório fica no bloco D, 2º andar. A entrada é feita pela entrada principal da Escola de Educação Física e Esporte (EEFE) da USP. Ao chegar, você deverá seguir o corredor à direita da entrada principal até o final, virar levemente à esquerda e continuar logo à direita, também até o final. No fim, você se deparará com uma quadra e um prédio branco. Esse prédio branco é o bloco D. Contorne para a frente do prédio, até a entrada.

Na entrada terá um elevador à direita, o laboratório fica no 2º andar. Ao sair do elevador, é a primeira porta à esquerda. Ao chegar, você pode me enviar uma mensagem para te buscar, caso queira. Mas ficam aqui essas orientações mais específicas para te ajudar.

O uso de máscara está obrigatório dentro da universidade, por isso, traga a sua!

Por fim, não coma antes de sair de casa! Ofereceremos um café da manhã padronizado no laboratório.

E durma bem!

Obrigada mais uma vez pela sua contribuição e compromisso conosco!

ETAPA 2 – DIA DO TESTE, PROCEDIMENTOS INICIAIS

1. Chegar 15 minutos antes do horário marcado com o voluntário;
2. Tirar a gasometria do stand-by e colocar para calibrar;
3. Limpar os seguintes locais:
 - ☐ Área em que efetuará as coletas de sangue;
 - ☐ Área em que o voluntário realizará o café da manhã;
 - ☐ A bicicleta que será utilizada durante o teste de VO2.
4. Separar todos os materiais necessários para a coleta de sangue conforme o protocolo de coleta, sendo:
 - ☐ Seringa de 10 mL para soro: 6 unidades (2 mL por vez)
 - ☐ Agulha para seringa do soro: 1 unidade
 - ☐ Seringa de 5 mL para descarte: 6 unidades (1 mL por vez)
 - ☐ Monovetete 2 mL: 31 unidades
 - ☐ Seringa de 5 mL para coleta de sangue: 9 unidades
 - ☐ Utensílio para leitura na gasometria: 31 unidades
 - ☐ Tubos de coleta de sangue com ativador de coágulo: 9 unidades
5. Identificar os tubos de coleta da seguinte forma:
 - ☐ JEJUM
 - ☐ PRÉ-TESTE
 - ☐ 30' DE TESTE
 - ☐ 60' DE TESTE
 - ☐ 90' DE TESTE

- ☐ 120' DE TESTE
- ☐ FIM DE TESTE
- ☐ 1H PÓS TESTE
- ☐ 2H PÓS TESTE

ETAPA 3 – COLETA DE SANGUE E AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

1. Explicar as etapas do dia para o voluntário;
2. Realizar a pesagem do voluntário;
3. Iniciar a coleta de sangue conforme o protocolo de coleta, com o voluntário ainda em jejum (anotar o horário de término no checklist);
4. Anotar na folha que saiu da gasometria as informações do tempo de coleta da mesma forma que anotou nos tubos de sangue;
5. Oferecer o café da manhã padronizado ao voluntário (anotar o horário de término no checklist);
6. Oferecer a primeira de quatro doses da suplementação e contar 10 minutos (anotar o horário de término no checklist);
7. Oferecer a segunda de quatro doses da suplementação e contar 10 minutos (anotar o horário de término no checklist);
8. Oferecer a terceira de quatro doses da suplementação e contar 10 minutos (anotar o horário de término no checklist);
9. Oferecer a quarta de quatro doses da suplementação e contar 30 minutos (anotar o horário de término no checklist);
10. Realizar a avaliação antropométrica;
11. Finalizado os 30 minutos, realizar uma nova coleta de sangue (anotar o horário de término no checklist);
12. Anotar na folha que saiu da gasometria as informações do tempo de coleta da mesma forma que anotou nos tubos de sangue;
13. Pegar a chave do laboratório de genética para preparação do soro para análise.

ETAPA 4 – TESTE EXPERIMENTAL

1. Ajustar a bicicleta conforme as preferências do voluntário (alturas e distâncias do banco e guidão).
2. Organizar a mesa com os itens necessários para o teste:
 - ☐ Escala de percepção de esforço;
 - ☐ Frequencímetro;
 - ☐ Garrafa de água cheia para o voluntário;
 - ☐ Computador com Lode Ergonometry Manager 10 instalado e com o voluntário e teste cadastrados;
 - ☐ Celular com o aplicativo Polar Beat instalado e pareado com o frequencímetro a ser utilizado.
3. Colocar o protocolo do teste experimental para o voluntário em questão;
4. Explicar o teste para o voluntário e iniciar o teste;
5. Realizar as coletas de sangue durante o teste, anotar a frequência cardíaca e a percepção de esforço durante o teste conforme o checklist.

ETAPA 5 – PÓS-TESTE

1. Coletar a amostra de sangue pós-teste (anotar o horário de término no checklist);
2. Higienizar todos os equipamentos utilizados durante o teste (principalmente a bike e lugares que podem eventualmente ter sujado de sangue);
3. Levantar as amostras para centrifugar e seguir o protocolo específico para tal. Serão necessários ao todo 18 tubos de Eppendorf de 5 mL. Cada tubo deve ser identificado da seguinte forma:
 - ☐ Tampa: sigla do voluntário (ex: A01) + tempo da coleta (ex: J) + data abreviada (ex: 12/05);
Tempos: jejum (J), pré-teste (PRÉ), 30' de teste (30'), 60' de teste (60'), 90' de teste (90'), 120' de teste (120'), fim de teste (FIM), 1h pós teste (1H) e 2h pós teste (2H).
 - ☐ Corpo: sigla do voluntário + data completa (ex: 21/01/22) + tempo de coleta + abreviações do nome do voluntário (ex: NSR).
Tempos: jejum, pré-teste (PRÉ), 30' de teste (30'), 60' de teste (60'), 90' de teste (90'), 120' de teste (120'), fim de teste (FIM), 1h pós teste (1H) e 2h pós teste (2H).
4. Retornar ao laboratório do segundo andar para coleta das amostras de 1 e 2 horas pós teste (anotar o horário de término no checklist);
5. Realizar o Recordatório Alimentar de 24hrs;
6. Finalizadas as coletas, limpar todas as superfícies, fechar as janelas, desligar o ar-condicionado e colocar a gasometria em stand-by.

Figura 18 – Checklist utilizado na primeira visita ao laboratório

ESTUDO ACIDOSE

Nome completo do voluntário: _____

Identificação: _____ Data de realização: ____/____/____ T (°C): ____ Umidade: _____

COLETA BASAL + VO_2 MÁX

CHECK-LIST DO DIA DE TESTE

- ☐ Explicação dos procedimentos do dia para o voluntário;
- ☐ Entrega e assinatura do TCLE;
- ☐ Pesagem e altura do voluntário:
 - ☐ Peso: ____
 - ☐ Altura: ____
- ☐ Coleta em jejum: ____:____
- ☐ Café da manhã: ____:____
- ☐ Coleta 30' pós CM (C2): ____:____
- ☐ Cadastro do voluntário no programa Omnia;
- ☐ Cadastro do voluntário no programa Lode Ergometry Manager 10;
- ☐ Coleta 60' pós C2: ____:____
- ☐ Coleta do recordatório alimentar 24h;
- ☐ Aplicação do IPAQ;
- ☐ Retirada da chave do laboratório de genética;
- ☐ Calibração do K5;
- ☐ Coleta 120' pós C2: ____:____
- ☐ Explicar teste para o voluntário;
- ☐ Início do teste de VO_2 MÁX: ____:____
- ☐ Término do teste de VO_2 MÁX: ____:____
- ☐ Retirar frequencímetro do voluntário;
- ☐ Centrifugação do sangue coletado no basal;
- ☐ Devolução da chave do laboratório de genética;
- ☐ Organização do laboratório de exercícios físicos;
- ☐ Limpeza de todas as superfícies utilizadas (principalmente a bike e locais que podem, eventualmente, ter sujado de sangue);
- ☐ Fechar janelas, desligar o ar-condicionado e colocar a gasometria em stand-by.

APÊNDICE B – Tabela do formulário de interesse no estudo

Tabela 3 – Seções, temas e descrições do formulário de triagem

Seção	Tema	Descrição
1	Formulário de interesse no estudo	Introdução sobre a importância do formulário e o tempo estimado de preenchimento (5 minutos).
2	Dados pessoais	Nome completo, data de nascimento, sexo (feminino, masculino, outros), celular (WhatsApp), e-mail principal.
3	Suplementação e alimentação	Uso atual de suplemento alimentar (sim/não).
4	Suplementação e alimentação	Confirmação de não uso de suplementos (creatina, beta-alanina, bicarbonato de sódio, cafeína, proteínas, vitaminas).
5	Suplementos atuais	Indicação dos suplementos atualmente consumidos (creatina, beta-alanina, bicarbonato de sódio, cafeína, proteínas, vitaminas).
6	Histórico de suplementação	Uso de beta-alanina nos últimos três meses (sim/não).
7	Alimentação	Intolerância ou alergia alimentar (sim/não).
10	Modalidade e treinamento	Principal modalidade esportiva (ciclismo, triatlo, corrida, crossfit, outros).
11	Modalidade e treinamento	Hábito de pedalar mesmo sem ser o esporte principal (sim/não).
12	Modalidade e treinamento	Tipo de ciclismo praticado (estrada, MTB, BMX, outros), tempo de treino, quilômetros e horas semanais pedaladas.
13	Modalidade e treinamento	Capacidade para realizar teste de 2 horas com <i>sprints</i> a cada 10 minutos e finalização com <i>sprint</i> de 30 segundos (sim/não).
14	Hábitos e histórico de saúde	Diagnóstico prévio de doenças (anemia, asma, colesterol alto, diabetes, doença cardiovascular).
16	Disponibilidade	Disponibilidade para ir ao laboratório de manhã (06h às 13h) (sim/não).
17	Disponibilidade	Dias da semana com disponibilidade (segunda a sábado, horários flexíveis) e indicação de quatro datas disponíveis no período da manhã.
18	Agradecimento	Mensagem final agradecendo o interesse, informações sobre o contato para agendamento e espaço para dúvidas.

APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido

Figura 19 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no estudo

A influência do pH na resposta metabólica óssea ao exercício (TCLE versão 1/ 16.07.2019)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

Nome Completo: _____ Sexo: M ☐ F ☐
 Documento de identidade Nº: _____ Data nascimento: ____/____/____
 Endereço: _____ Nº: _____ Apto: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____
 Telefone: _____ Email: _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título de pesquisa: A influência do pH na resposta metabólica óssea ao exercício

Pesquisador: Eimear Dolan

Cargo/função: Pós-doutoranda

Unidade do HCFMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

2. Avaliação do risco da pesquisa:

☐ Risco mínimo ☒ Risco baixo ☐ Risco médio ☐ Risco alto

3. Duração da pesquisa: 2 meses

4. Apresentação:

Por meio desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, convidamos o(a) senhor(a) para fazer parte da nossa pesquisa científica. Uma pesquisa científica constitui, basicamente, em um estudo que, por meio de diversos processos, tem o objetivo de criar ou aumentar o conhecimento sobre um determinado assunto. As descobertas realizadas dentro de uma pesquisa, embora frequentemente não tragam benefícios diretos ao participante da mesma, podem ser úteis para muitos indivíduos no futuro.

E, para que o(a) senhor(a) decida se aceita ou não participar desta pesquisa, é necessário que entenda o suficiente sobre seus riscos e benefícios, para que, dessa forma, possa fazer um julgamento consciente e tomar sua decisão. A partir disto, inicialmente explicaremos as razões para realização da nossa pesquisa e, depois, forneceremos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em si, que é um documento que confirma todas as informações sobre a

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

pesquisa e possibilita a sua realização, através da análise das informações obtidas de maneira confidencial.

É importante que leia atentamente o termo, discuta com pessoas de sua confiança ou familiares e, uma vez compreendido os objetivos da pesquisa e todos os seus procedimentos, caso tenha interesse em participar, será solicitada a sua rubrica (visto) em todas as páginas do TCLE e a sua assinatura na última página. Após assinar, uma via deste termo deverá ser guardada com o(a) senhor(a) ou com o seu representante legal e uma cópia será arquivada pelo(a) pesquisador(a) responsável.

5a) Justificativa, objetivos e procedimentos:

- I. O objetivo desse estudo é investigar como as alterações do pH influenciam a remodelação óssea. A remodelação óssea é, basicamente, um processo em que o tecido ósseo maduro é removido e um novo tecido é formado. Para isso, será realizado um teste de ciclismo prolongado, que será intercalado com *sprints* (tiros) de alta intensidade, em que haverá a indução de alcalose (aumento do pH) ou acidose (diminuição do pH) antes da realização do teste.
- II. Sua participação no estudo terá 4 visitas ao laboratório. Na primeira visita, você realizará um teste de potência máxima (que será usado para determinar a carga relativa na qual os testes de exercício subsequentes serão feitos). Após 20 a 30 minutos de recuperação, completará o teste de ciclismo prolongado para se familiarizar com o protocolo. Este teste é similar a uma competição de ciclismo, demora 2 horas no total e é intercalado com 6 *sprints* de alta intensidade. O teste terminará com a realização de um teste Wingate de 30 segundos, em que irá pedalar o mais rápido que puder durante 30 segundos. As próximas três sessões compreendem as sessões de teste experimentais, e serão realizadas em ordem aleatória, com pelo menos 1 semana de intervalo entre cada sessão. Quando chegar ao laboratório, irá ingerir um suplemento, que pode ser: 1 - placebo (farinha branca); 2 - substância indutora de alcalose (bicarbonato de sódio) e 3 - substância indutora de acidose (cloreto de amônio). 60 minutos após a ingestão das cápsulas, iniciará o teste do exercício. Um cateter será colocado na veia antecubital, localizada no antebraço, e amostras de sangue de 4 mL serão coletadas antes do teste, a cada 15 minutos durante o teste, e antes e depois do teste Wingate final. As amostras também serão coletadas às +1, 2, 3 e 4 horas após o exercício. Além disso, amostras muito pequenas (135 µL) serão coletadas a cada 5 minutos durante todo o teste e usadas imediatamente para medir o bicarbonato, pH e cálcio ionizado. Amostras de urina serão coletadas em todos esses momentos, exceto durante o exercício, e usadas para medir a excreção de bicarbonato.
- III. Todos os testes acontecerão entre 07h00 e 09h00. Antes das sessões de teste experimentais, você receberá um café da manhã padronizado e será obrigatório que você consuma o café ofertado (e somente isso) ao acordar. Precisar chegar ao laboratório dentro de 60 minutos após o café da manhã. Solicitaremos que mantenha seus hábitos alimentares e rotina de atividade física normais durante os 3 dias anteriores ao teste e para repetir essas práticas para cada um dos testes subsequentes. Além disso, será solicitado a evitar quaisquer atividades incomuns ou muito extenuantes, ou a ingestão de álcool durante dois dias anteriores ao teste.

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

5b) Desconfortos, riscos e benefícios

- I. O teste físico é intenso e, por isso, é importante que você esteja fisicamente bem treinado, o que significa que precisa pedalar habitualmente pelo menos 60km/semana.
- II. O momento da punção da veia para inserir o cateter e coletarmos a amostra de sangue pode trazer desconforto no braço e, após o procedimento, você pode ter a região um pouco arroxeadas e um pouco de sensibilidade no local em que o cateter foi inserido.
- III. Ao ingerir o suplemento alcalino, algumas pessoas podem apresentar um pouco de desconforto gastrointestinal. Entretanto, a dosagem oferecida é uma dosagem comumente usada em estudos como este, escolhida para justamente minimizar o risco de desconforto gastrointestinal.
- IV. Ao participar como voluntário desta pesquisa, você terá acesso a avaliações padrão-ouro do seu condicionamento físico.
- V. Você, ainda, terá direito a consultas nutricionais, onde você receberá aconselhamento profissional sobre como pode melhorar seus hábitos alimentares. Além disso, você poderá tirar todas as dúvidas que tiver sobre seu desempenho nos testes e sobre sua alimentação.

5c) Forma de acompanhamento e assistência

Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. A investigadora principal é Eimear Dolan, que pode ser encontrada na Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César, São Paulo - SP, 01246-903; telefone: 2648-1337; e-mail: eimeardolan@usp.br. Caso apresente qualquer evento adverso, entre em contato com os investigadores. Além disso, se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - 21º andar - sala 36 - CEP: 01246-000, horário de atendimento: 8:00-17:00h; Tel: (11)3893-4401/4407 - E-mail: cep.fm@usp.br.

5d) Liberdade de recusar-se e retirar-se do estudo

A escolha de entrar ou não nesse estudo é inteiramente sua. Caso o(a) senhor(a) se recuse a participar deste estudo, o(a) senhor(a) receberá o tratamento habitual, sem qualquer tipo de prejuízo ou represália. O(A) senhor(a) também tem o direito de retirar-se deste estudo a qualquer momento e, se isso acontecer, seu médico continuará a tratá-lo(a) sem qualquer prejuízo ao tratamento ou represália.

5e) Manutenção do sigilo e privacidade

Os seus dados serão analisados em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente sob qualquer circunstância. Solicitamos sua autorização para que os dados obtidos nesta pesquisa sejam utilizados em uma publicação científica, sendo este

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

A influência do pH na resposta metabólica óssea ao exercício (TCLE versão 1/ 16.07.2019)

o meio pelo qual os resultados de uma pesquisa são divulgados e compartilhados com a comunidade científica.

5f) O (a) senhor(a) receberá uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido.

5g) Garantia de indenização

O(A) senhor(a) tem direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *A influência do pH na resposta metabólica óssea ao exercício*. Ficou claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro, também, que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

São Paulo, ____/____/____

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador