

GABRIEL HENRIQUE CASTANHO BARRETO

A influência do polimorfismo no gene CYP1A2 sobre as respostas fisiológicas e de desempenho após a suplementação de cafeína

São Paulo

2024

GABRIEL HENRIQUE CASTANHO BARRETO

A influência do polimorfismo no gene CYP1A2 sobre as respostas fisiológicas e de desempenho após a suplementação de cafeína

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Bryan Saunders

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barreto, Gabriel Henrique Castanho

A influência do polimorfismo no gene CYP1A2 sobre as respostas fisiológicas e de desempenho após a suplementação de cafeína / Gabriel Henrique Castanho Barreto; Bryan Saunders, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1.Genética humana 2.Suplementos nutricionais 3.Cafeína
4.Ciclismo 5.Desempenho atlético I.Saunders, Bryan, orient.
II.Título

USP/FM/DBD-348/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Nome: Gabriel Henrique Castanho Barreto

Título: A influência do polimorfismo no gene CYP1A2 sobre as respostas fisiológicas e de desempenho após a suplementação de cafeína

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são direcionados às partes do corpo que me auxiliaram durante o processo do meu doutorado.

Ao cérebro, Dr. Bryan Saunders, por todo o conhecimento transmitido com paciência, virtude e por ter me mostrado, como exceção à regra, que a relação de orientador-orientado pode ser pautada no respeito, na compreensão e no progresso individual.

Aos braços e pernas, meus colegas pesquisadores, principalmente à Dra. Luana Saunders, às doutorandas Tamires Nunes, Larissa Registro e ao Dr. Pietro Merola. Membros essenciais para a realização do trabalho, principalmente quando meus os meus próprios braços e pernas não aguentavam mais.

Ao sangue e suor cedidos pelos participantes dos estudos, que disponibilizaram seu tempo, receberam picadas e realizaram esforços em nome da ciência.

Aos pulmões, representados pelo incentivo financeiro concedido em três oportunidades pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Desde o início do programa de mestrado (2017/15314-1), passando pela transferência para o doutorado direto (2020/12036-3), até a oportunidade de realizar um estágio no exterior (2021/12116-0). A FAPESP é o órgão que permite que a ciência no Estado de São Paulo respire.

Aos ossos, representados pela estrutura cedida pelo professor Hamilton Roschel na Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, o que nos permitiu realizar os trabalhos propostos, mesmo nas adversidades enfrentadas.

Aos ombros e ouvidos dos meus familiares, amigos, colegas e todos aqueles que me acolheram, ouviram e me ajudaram a carregar o peso da vida quando tudo parecia impossível. Também ao útero, às entranhas, ao colo e aos corações da Castanho Adriana Camelo Nunes, do Paulo Fernando Camelo Nunes e da Ivone Beleze Castanho, que me deixaram de orelhas quentes muitas vezes, para que eu me transformasse no indivíduo que eu sou hoje.

RESUMO

BARRETO, G.H.C. **A influência do polimorfismo no gene CYP1A2 sobre as respostas fisiológicas e de desempenho após a suplementação de cafeína.** Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

A cafeína, um antagonista de receptores de adenosina, aumenta atenção e volição, reduz percepção de dor e fadiga e é amplamente utilizada para melhorar o desempenho esportivo. Existe alguma variabilidade nas respostas à cafeína que pode ser causada pelo polimorfismo CYP1A2 -164C>A (SNP-CYP1A2), que reduz a expressão da principal enzima metabolizadora de cafeína, criando os fenótipos: 1) AA, metabolizadores rápidos; 2) AC, intermediários e 3) CC, lentos. Com a maior afinidade dos principais metabólitos da cafeína com seus receptores, é possível que o genótipo CC obtenha menores benefícios ergogênicos. Para esta investigação, dois estudos foram realizados. No estudo A, não-controlado, 24 jovens do sexo masculino (13 AA, 9 AC e 2 CC) receberam 3 mg/kg de cafeína e tiveram medidas, por 24 horas, a intensidade de sintomas físicos e psicológicos, pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca e concentrações plasmáticas de cafeína e metabólitos. No estudo B, 91 ciclistas treinados (63 do sexo masculino e 28 do feminino, 37 AA, 47 AC e 7 CC) realizaram um teste contrarrelógio de ciclismo de 4 km de maneira randomizada e *quasi*-cega em 4 condições (CON, controle; PLA, placebo; CAF3 e CAF6, 3 e 6 mg/kg de massa corpórea de cafeína), obtendo medidas de desempenho, frequência cardíaca, percepção de esforço (PSE), lactato venoso e intensidade de sintomas físicos e psicológicos. O impacto do consumo de carboidratos no dia anterior (CHO), do consumo habitual de cafeína (HABCON) e do horário do dia em que os testes físicos foram realizados foi analisado. No estudo A, o SNP-CYP1A2 não afetou a área abaixo da curva para sintomas físicos ($p = 0,42$) ou psicológicos ($p = 0,10$), a pressão sistólica ($p = 0,052$), diastólica ($p = 0,11$) e frequência cardíaca ($p = 0,63$). HABCON não afetou estas medidas (todos $p \geq 0,38$). No estudo B, o desempenho melhorou em CAF3 (-5,23 s; 95% CI: -1,15; -9,32; $p = 0,04$) e CAF6 (-6,64 s; IC 95%: -2,56; -10,72; $p = 0,005$), sem influência do SNP-CYP1A2 sobre tempo, potência média, lactato, frequência cardíaca e PSE (todos $p \geq 0,30$) ou intensidade dos sintomas (todos $p \geq 0,18$). Contudo, menores tamanhos de efeito nas condições CAF3 e CAF6 foram encontrados para CCs ($D = 0,11$ e $0,11$) comparados com AAs ($D = 0,43$ e $0,50$) ou ACs ($D = 0,23$ e $0,45$). Somente CHO ($p_{CHO} = 0,02$) e HABCON ($p_{HABCON \times \text{condição}} = 0,004$) afetaram

o desempenho, mas apenas o impacto de CHO foi confirmado pelo modelo de reamostragem com imputações múltiplas (~100% de coeficientes > 0). Assim, conclui-se que o SNP-CYP1A2 não afeta significativamente as variáveis cardiovasculares, os sintomas físicos e psicológicos, ou os efeitos da cafeína sobre o desempenho esportivo, que parece ser afetado pelo consumo de carboidratos no dia anterior. Novos estudos devem confirmar os achados e investigar outros fatores que podem afetar a interação cafeína × genótipos.

Palavras-chave: genética humana, suplementos nutricionais, cafeína, ciclismo, desempenho atlético.

ABSTRACT

BARRETO, G.H.C. **The influence of the polymorphism in the CYP1A2 gene on physiological and performance responses following caffeine supplementation.** Thesis (Doctor of Science) – Faculty of Medicine of the University of São Paulo, 2024.

Caffeine, an adenosine receptor antagonist, enhances attention and volition, reduces the perception of pain and fatigue, and is widely used to improve athletic performance. There is some variability in responses to caffeine, which may be caused by the CYP1A2 -164C>A polymorphism (SNP-CYP1A2), which reduces the expression of the main enzyme responsible for metabolising caffeine, resulting in the following phenotypes: 1) AA, fast metabolisers; 2) AC, intermediate metabolisers; and 3) CC, slow metabolisers. With greater affinity of the main metabolites for receptors, it is possible that the CC genotype derives fewer benefits. For this investigation, two studies were conducted. In Study A, an uncontrolled study, 24 young males (13 AA, 9 AC, and 2 CC) received 3 mg/kg of caffeine, and for 24 hours, the intensity of physical and psychological symptoms, systolic and diastolic blood pressure, heart rate, and plasma concentrations of caffeine and metabolites were measured. In Study B, trained cyclists (63 males and 28 females, 37 AA, 47 AC, and 7 CC) performed a 4 km cycling time trial in a randomised, quasi-blind manner under four conditions (CON, control; PLA, placebo; CAF3 and CAF6, 3 and 6 mg/kg of body mass of caffeine), with measurements of performance, heart rate, perceived exertion (RPE), venous lactate, and symptom intensity. The impact of carbohydrate intake the previous day (CHO), habitual caffeine consumption (HABCON), and time of day was analysed. In Study A, SNP-CYP1A2 did not affect the area under the curve for physical ($p = 0.42$) or psychological ($p = 0.10$) symptoms, systolic pressure ($p = 0.052$), diastolic pressure ($p = 0.11$), or heart rate ($p = 0.63$). HABCON did not affect these measurements (all $p \geq 0.38$). In Study B, performance improved in CAF3 (-5.23 s; 95% CI: -1.15, -9.32; $p = 0.04$) and CAF6 (-6.64 s; 95% CI: -2.56, -10.72; $p = 0.005$), with no influence of SNP-CYP1A2 on time, average power, lactate, heart rate, RPE (all $p \geq 0.30$), or symptom intensity (all $p \geq 0.18$). However, smaller effect sizes in CAF3 and CAF6 were found for CCs ($D = 0.11$ and 0.11) compared to AAs ($D = 0.43$ and 0.50) or ACs ($D = 0.23$ and 0.45). Only CHO ($p_{\text{CHO}} = 0.02$) and HABCON ($p_{\text{HABCON} \times \text{condition}} = 0.004$) affected performance, but only the impact of CHO was confirmed by the resampling model with multiple imputations (~100%

of coefficients > 0). It is concluded that SNP-CYP1A2 does not significantly affect cardiovascular variables, physical and psychological symptoms, or the effects of caffeine on athletic performance, which appears to be influenced by carbohydrate intake the previous day. Further studies should confirm these findings and investigate other factors that may affect caffeine \times genotype interactions.

Keywords: human genetics, nutritional supplements, caffeine, bicycling, athletic performance.

LISTA DE IMAGENS

Figura 1. Estrutura química da cafeína e da adenosina.	19
Figura 2. Consumo e metabolização da cafeína em seus metabólitos primários paraxantina, teobromina e teofilina.....	21
Figura 3. Sítios em que a cafeína pode atuar na melhora do desempenho esportivo e causar outras alterações fisiológicas.	24
Figura 4. A estrutura do gene CYP1A2. Os íntrons estão representados como linhas horizontais e os exons como linhas verticais e caixas. As flechas são as posições dos primers para a identificação e início do sequenciamento.	27
Figura 5. A cafeína e seus metabólitos são inibidores não-seletivos de receptores de adenosina. Alguns metabólitos têm maior afinidade com os receptores que a própria cafeína. Figura adaptada e traduzida de Barreto et al. (2021).....	28
Figura 6. Procedimentos realizados no estudo A (painel A) e o desenho da visita, com os procedimentos a serem realizados em cada ponto no tempo (painel B).....	38
Figura 7. Desenho experimental do Estudo B, sem incluir a visita relacionada ao Placebo Aberto (painel A) e o esquema logístico das visitas (painel B).	43
Figura 8. Valores de média estimada de área abaixo da curva e seus intervalos de confiança de 95%, valores de p da comparação, além de valores individuais de sintomas psicológicos (painel A) e físicos (painel B) entre os genótipos CYP1A2. À direita, as linhas grossas azuis e vermelhas representam a média dos valores de sintomas ao longo do tempo para os genótipos AA e ACCC, respectivamente. As linhas finas e pontos representam os valores individuais dos participantes a cada ponto no tempo separados entre os genótipos AA (azuis) e ACCC (vermelhos).....	61
Figura 9. Fluxo de participantes do estudo B.....	64
Figura 10. Valores de média e erro padrão (SE) estimados de: painel 1) tempo até completar o contrarrelógio de 4 km e painel 2) potência média produzida (W) separados por condição. *, diferença da condição placebo significativa detectada pelo post-hoc com ajuste de Bonferroni.....	66
Figura 11. Distribuição dos efeitos encontrados nos 5000 modelos estimados para as variáveis que tiveram valor de probabilidade significativa.	73
Figura 12. Gráfico forest dos efeitos da cafeína nos trabalhos previamente publicados utilizando os testes de contrarrelógio de 4 km, incluindo os obtidos neste trabalho (Barreto). “Barreto, 9, 2025.1” se refere aos resultados na dose de 6 mg/kg, enquanto “Barreto, 9, 2025.2” reflete a dose de 3 mg/kg...	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da dieta oferecida aos voluntários ao longo das 24 horas do Estudo A. T ₀ , representa o horário de ingestão da cápsula.	41
Tabela 2. Características dos 24 participantes do Estudo A separados por genótipo.	59
Tabela 3. Valores de pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca estimados pelo modelo linear misto e seus valores de Intervalo de Confiança de 95% (95% CI) separados por genótipo.	63
Tabela 4. Caracterização dos participantes separados por sexo e genótipo. Com exceção do consumo habitual de cafeína, os valores estão representados em médias e desvios padrão.	65
Tabela 5. Valores de média estimada e erro padrão (SE), diferença estimada pelo modelo linear misto e seus intervalos de confiança de 95%, além de valores de tamanho de efeito (D de Cohen) e seus intervalos de confiança de 95% para frequência cardíaca, lactato pós-exercício, potência média e PSE média (percepção subjetiva de esforço) separados por genótipo CYP1A2. As comparações demonstradas são entre a condição (coluna condição) e a condição placebo.	69
Tabela 6. Tabela de contingência demonstrando a contagem de respostas "Não sei", "Placebo" e "Cafeína" para o questionário pós-exercício entre as condições PLACEBO, CAF3 e CAF6, além dos valores de resíduos padronizados para cada combinação (entre parêntesis). Valores próximos a ou mais extremos que 2 (ou -2) são considerados de alto impacto sobre o teste qui-quadrado.	71
Tabela 7. Valores medianos calculados de coeficiente de variação (CV), mínimo e máximo para Energia, Carboidratos, Proteínas e Lipídios ingeridos em g, ou em kcal para Energia, dividido pela massa corpórea.	72
Tabela 8. Estimates médios, intervalos de credibilidade e valores de p (probabilidade de efeito > 0) calculados após 5000 reamostragem com 5 imputações múltiplas cada.	74
Tabela 9. Tamanhos de efeito observados em meta-análise, excluindo estudos com alto risco de viés, comparados com os tamanhos de efeito encontrados neste trabalho.	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Cafeína, da ingestão à excreção	18
2.1.1 Visão geral	18
2.1.2 Absorção, dissipação, metabolismo (CYP1A2) e excreção	19
2.2 Efeitos da cafeína	21
2.2.1 Mecanismos	21
2.2.2 Cafeína no esporte	24
2.3 CYP1A2 -164 A>C	26
2.3.1 Visão geral.....	26
2.3.2 Implicações no esporte	28
2.3.3 Interação com outros genes e fatores ambientais.....	32
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.2. Objetivos específicos	36
3.2.1 Estudo A.....	36
3.2.2 Estudo B.....	36
4. MÉTODOS.....	37
4.1 Estudo A.....	37
4.1.1 Desenho experimental.....	37
4.1.2 Amostra	38
4.1.3 Caracterização	39
4.1.4 Padronização.....	39
4.1.5 Visita principal	39
4.2 Estudo B – Desempenho físico	41
4.2.1 Desenho experimental	41
4.2.2 Recrutamento	43
4.2.3 Tamanho amostral	44
4.2.4 Critérios de seleção.....	45
4.2.5 Teste Incremental.....	45
4.2.6 Composição corporal	46
4.2.7 Diários alimentares	46

4.2.8 Randomização e cegamento.....	47
4.2.9 Visitas principais	48
4.2.10 Teste de contrarrelógio de 4 km de ciclismo.....	49
4.3 Métodos comuns aos Estudos A e B.....	50
4.3.1 Questionário de Frequência Alimentar para alimentos-fonte de cafeína	50
4.3.2 Questionário de sintomas habituais (Q-HAB).....	51
4.3.3 Recordatório alimentar de 24 horas	52
4.3.4 Questionário de sintomas agudos.....	52
4.3.5 Processamento e análise das amostras biológicas.....	52
4.3.6 Isolamento de DNA e genotipagem.....	53
4.3.7 Quantificação de cafeína e seus metabólitos	53
4.4 Análises estatísticas.....	54
4.4.1 Estudo A	54
4.4.2 Estudo B	55
5. RESULTADOS	59
5.1. Estudo A.....	59
5.1.1 Caracterização	59
5.1.2 Sintomas	60
5.1.3 Pressão arterial (sistólica e diastólica) e frequência cardíaca	62
5.1.4 Influência do consumo habitual sobre os sintomas e medidas cardiovasculares	62
5.2. Estudo B.....	63
5.2.1 Caracterização	63
5.2.2 Cafeína x genótipos no desempenho	66
5.2.2.1 Tempo.....	66
5.2.3 Intensidade dos sintomas	71
5.2.4 Cegamento.....	71
5.2.5 Dieta.....	72
5.2.6 Influência de outros fatores sobre o delta Tempo	72
5.2.7 Modelo <i>stepwise</i> com imputação múltipla e reamostragem	73
6. DISCUSSÃO	75
6.1 Estudo A.....	75
6.2 Estudo B.....	79
7. CONCLUSÃO E APLICAÇÕES PRÁTICAS	94

REFERÊNCIAS	95
ANEXOS.....	110
APÊNDICES	112

1. INTRODUÇÃO

A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo, sendo a maior parte proveniente do consumo de café, mas também de outras fontes como chocolates, refrigerantes de cola, bebidas energéticas e suplementos (KEISLER; ARMSEY, 2006). Os efeitos mais conhecidos provenientes de seu consumo são a agitação psicomotora e o aumento do estado de alerta que ocorrem por meio da sua capacidade de antagonizar principalmente os receptores de adenosina de tipo A_{2A} no sistema nervoso central (EL YACOUBI; LEDENT; MENARD; PARMENTIER *et al.*, 2000). Em adição, a cafeína tem a capacidade de reduzir a percepção subjetiva de dor e fadiga, o que pode ser positivo no cenário dos esportes (SOKMEN; ARMSTRONG; KRAEMER; CASA *et al.*, 2008). De fato, já há evidências robustas para afirmar que a cafeína pode ser considerada um recurso ergogênico para a maioria das modalidades esportivas de força, *endurance*, ou intermitentes (GRGIC; GRGIC; PICKERING; SCHOENFELD *et al.*, 2019). Por isto, a cafeína figura a lista do Comitê Olímpico Internacional entre as substâncias com maior nível de evidência de um real efeito ergogênico (MAUGHAN; BURKE; DVORAK; LARSON-MEYER *et al.*, 2018). Contudo, parece haver alguma variabilidade nas respostas à suplementação de cafeína (PICKERING; KIELY, 2018).

Apesar de melhorar o desempenho esportivo na maior parte dos casos, alguns indivíduos parecem obter menores benefícios – ou até efeitos ergolíticos – da suplementação aguda de cafeína (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021; PICKERING; KIELY, 2018). Esta variabilidade pode ter origem em fatores diversos como a habituação ao consumo de cafeína (CARVALHO; MARTICORENA; GRECCO; BARRETO *et al.*, 2022), uma maior ocorrência de efeitos colaterais como ansiedade (PICKERING; KIELY, 2018), agitação, tremores, insônia e sintomas gastrointestinais (CHILDS; HOHOFF; DECKERT; XU *et al.*, 2008; DE SOUZA; DEL COSO; FONSECA; SILVA *et al.*, 2022; GUEST; VANDUSSELDORP; NELSON; GRGIC *et al.*, 2021), além da variabilidade causada por um efeito placebo inerente de toda intervenção aguda (MARTICORENA; CARVALHO; OLIVEIRA; DOLAN *et al.*, 2021). Além destes, um polimorfismo de nucleotídeo simples no gene que expressa a enzima do complexo citocromo P450 1A2 (CYP1A2 -164 A>C) parece exercer influência sobre estas respostas (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021; GRGIC; PICKERING; DEL COSO; SCHOENFELD *et al.*, 2021; SOUTHWARD; RUTHERFURD-MARKWICK; BADENHORST; ALI, 2018). Hipotetiza-se que, sendo a enzima CYP1A2 a mais importante metabolizadora de cafeína em seres humanos, diferentes taxas de expressão podem alterar a velocidade de transformação da cafeína em seus metabólitos

(BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021), sendo que alguns deles têm maior afinidade com os receptores de adenosina (DALY; BUTTS-LAMB; PADGETT, 1983). Deste modo, uma redução na velocidade de metabolização, como parece ser o caso para os carreadores do alelo C, poderia afetar a intensidade e o tempo até que o máximo efeito da suplementação seja atingido (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021).

De fato, uma parte da evidência sugere que os carreadores do alelo C parecem se beneficiar em menor proporção em comparação aos homozigotos AA, muitas das vezes obtendo uma piora no desempenho físico (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024). Contudo, ainda não há evidência suficiente para afirmar categoricamente que esta diferença no efeito agudo da suplementação de cafeína entre genótipos existe e, caso exista, qual o seu tamanho. Também, as alterações metabólicas e mecánísticas que poderiam estar por trás destas diferenças ainda não foram totalmente exploradas e permanecem no campo hipotético. Deste modo, este trabalho avaliou a influência deste polimorfismo (CYP1A2 -164 A>C) sobre as respostas psicofisiológicas e de desempenho físico à suplementação de cafeína.

2. REVISÃO DA LITERATURA

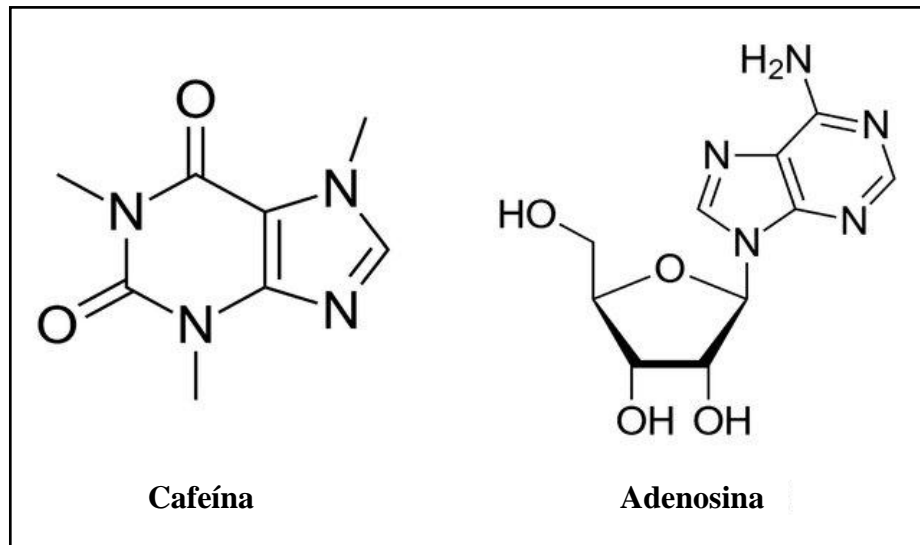
2.1 Cafeína, da ingestão à excreção

2.1.1 Visão geral

A cafeína e seus metabólitos (teofilina, teobromina e paraxantina) são substâncias alcaloides do grupo das xantinas e são derivadas de plantas como o *Coffea arabica* (café) e *Camellia sinensis* (chá verde) (ASHIHARA; CROZIER, 2001). Outras fontes comuns são os alimentos derivados de cacau (*Theobroma cacao*) (HECKMAN; WEIL; GONZALEZ DE MEJIA, 2010), da erva mate (*Ilex paraguayensis*) (HECKMAN; WEIL; GONZALEZ DE MEJIA, 2010), do guaraná (*Paullinia cupana*) (SCHIMPL; DA SILVA; GONCALVES; MAZZAFERA, 2013) e da cola (*Cola nitida* ou *Cola acuminata*), mais comumente encontrada em refrigerantes (BURDOCK; CARABIN; CRINCOLI, 2009). Sua denominação é dada de acordo com o número de grupos metila que carregam, chamando-se trimetilxantina (cafeína) e dimetilxantina (teofilina, teobromina e paraxantina) (ARNAUD, 2011).

Devido à similaridade de suas estruturas à da adenosina, as metilxantinas agem como antagonistas dos receptores desta molécula (Figura 1), evitando que exerçam suas funções normais (DALY; BUTTS-LAMB; PADGETT, 1983). A adenosina, por sua vez, é um dos substratos da quebra de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) (PARK; GUPTA, 2013). Sua concentração aumenta principalmente em momentos de alta demanda energética, quando o suprimento de oxigênio não é suficiente para manter a fosforilação de difosfato de adenosina de volta para ATP (PARK; GUPTA, 2013). Seus níveis aumentam constantemente ao longo do dia e tem como função secundária a de regular a atividade celular em tecidos como o cardíaco, vascular, adiposo e também no cérebro (PARK; GUPTA, 2013). Quatro subtipos de receptores para adenosina foram descritos: a1, A2A, a2b e a3 (FREDHOLM; AP; JACOBSON; KLOTZ *et al.*, 2001). A cafeína é um antagonista não seletivo destes receptores, que estão distribuídos em praticamente todos os tecidos e sugere-se que seus efeitos estimulantes estejam relacionados ao antagonismo de receptores de tipo A2A no sistema nervoso central (DAVIS; ZHAO; STOCK; MEHL *et al.*, 2003).

Figura 1. Estrutura química da cafeína e da adenosina.



Fonte: Adaptado e traduzido de (RODAK; KOKOT; KRATZ, 2021)

2.1.2 Absorção, dissipação, metabolismo (CYP1A2) e excreção

Quando consumida por via oral, a cafeína é absorvida em toda a extensão do trato gastrointestinal através da mucosa e atinge seu pico de concentração entre 15 e 120 minutos dependendo do conteúdo presente na luz gástrica e da forma de administração (BRUCE; SCOTT; LADER; MARKS, 1986; KAMIMORI; KARYEKAR; OTTERSTETTER; COX *et al.*, 2002). Quando administrada na forma mais comum para o fim esportivo (i.e., em cápsulas), o pico ocorre entre 60 e 120 minutos de maneira dose-dependente (BRUCE; SCOTT; LADER; MARKS, 1986). Na forma de chiclete, em contraste, o tempo de absorção é de aproximadamente 15 a 30 minutos, já que a absorção ocorre já na cavidade oral e na luz esofágica (KAMIMORI; KARYEKAR; OTTERSTETTER; COX *et al.*, 2002). Apesar disto, a realização de bochecho com soluções de cafeína parece não aumentar os níveis plasmáticos de cafeína, provavelmente devido ao baixo tempo de exposição da solução à mucosa oral (DOERING; FELL; LEVERITT; DESBROW *et al.*, 2014). Quando absorvida, sua dispersão ocorre através da corrente sanguínea e atinge todos os tecidos igualmente após 30 a 60 minutos (MAGKOS; KAVOURAS, 2005), incluindo o tecido cerebral. Lipofílica, o transporte da cafeína se dá em sua maioria por difusão facilitada através da barreira hematoencefálica (ARNAUD, 2011), mas uma pequena parcela é transportada ativamente pelos transportadores de adenina, o que pode causar um limite na disposição de cafeína para o cérebro, especialmente em doses mais altas (MCCALL; MILLINGTON; WURTMAN, 1982). As dimetilxantinas (DMX), comparativamente, apresentam menor capacidade de transpor a barreira

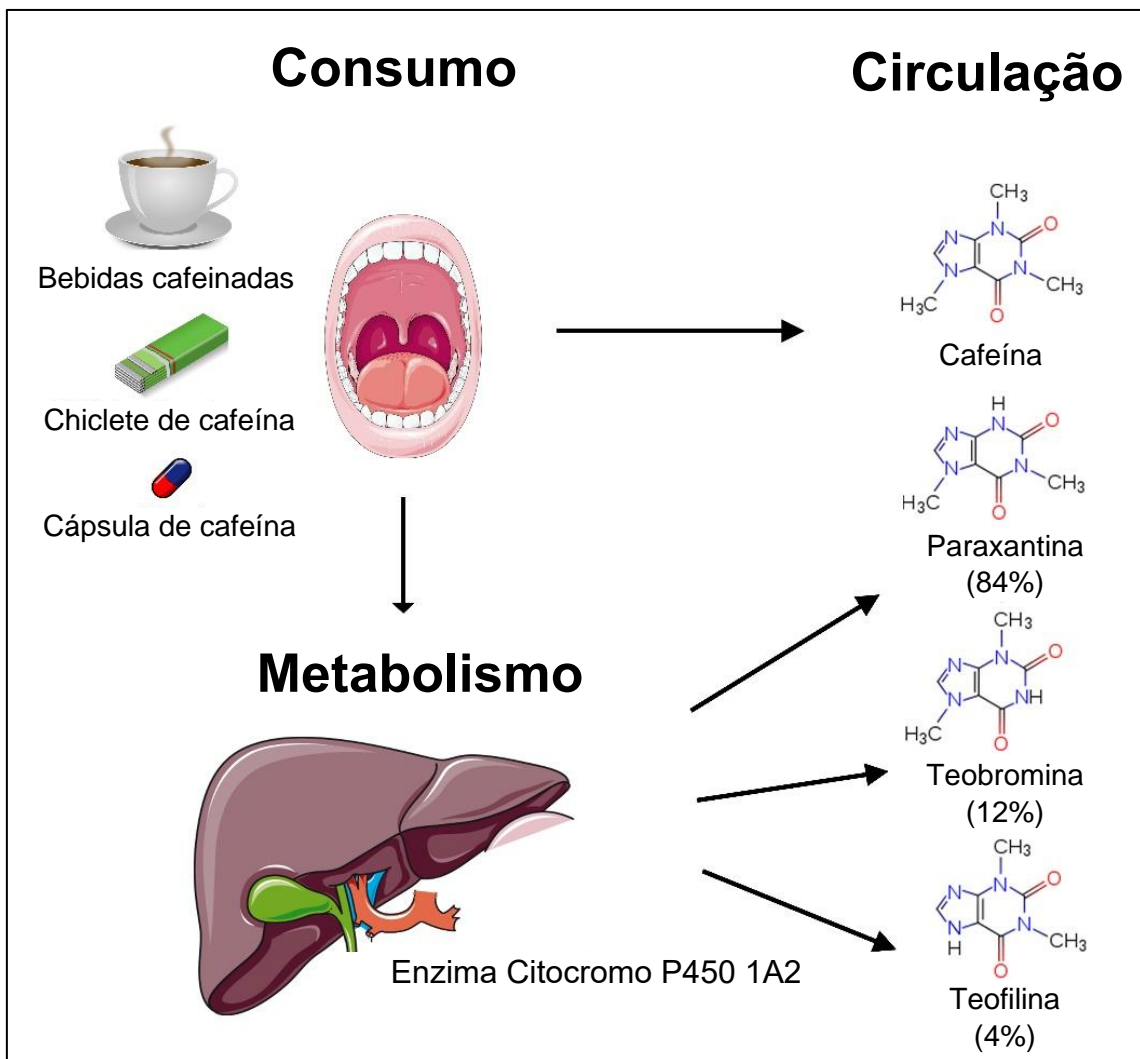
hematoencefálica, sendo encontradas razões de concentração cérebro-sangue de 0,6; 0,3 e 0,5 para teobromina, paraxantina e teofilina, (ARNAUD, 2011).

A cafeína é metabolizada principalmente pela enzima CYP1A2, que faz parte do complexo enzimático citocromo P450. Esta é responsável por cerca de 95% da transformação das xantinas em seus metabólitos (RAHIMI, 2019). Após a absorção, chegando no fígado, a cafeína é metabolizada em uma das três DMX: 1) 1,3-DMX (teofilina); 2) 1,7-DMX (paraxantina); ou 3) 3,7-DM9X (teobromina) (MAGKOS; KAVOURAS, 2005); através de desmetilação por esta enzima (Figura 2). As taxas de excreção da cafeína são diretamente afetadas pela velocidade de metabolização, levando a uma grande variabilidade em sua vida média (ARNAUD, 2011). A maior parte dos metabólitos da cafeína é excretada via rins, sendo que apenas aproximadamente 10% de toda paraxantina, teofilina e teobromina são excretadas intactas na urina e o restante pode sofrer mais uma desmetilação pela CYP1A2, produzindo 1-metilxantina, 3-metilxantina ou 7-metilxantina. Pode ocorrer também o processo de hidroxilação, do qual a enzima CYP1A2 também participa de maneira limitada (PERERA; GROSS; MCLACHLAN, 2012). Entende-se que a enzima CYP1A2 participa não somente da transformação da cafeína em seus metabólitos primários, mas também da desmetilação adicional que os transformará em seus metabólitos mais excretáveis (ARNAUD, 2011).

Além das metilxantinas, esta enzima também tem grande participação na metabolização de algumas drogas como paracetamol, propranolol, tacrina, olanzapina (ZHOU; YANG; ZHOU; LIU *et al.*, 2009); além de algumas substâncias carcinogênicas como aminas heterocíclicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aflatoxinas (FONTANA; LOWN; PAINE; FORTLAGE *et al.*, 1999; LIANG; LI; MCKINNON; DUFFY *et al.*, 1996), e também melatonina (ZHOU; YANG; ZHOU; LIU *et al.*, 2009). Sua expressão nas células hepáticas sofre influência de diversos fatores ambientais como dieta, estilo de vida e o consumo de fármacos. Alguns vegetais do grupo das brássicas como o brócolis e a couve-flor parecem aumentar a indutibilidade da enzima (PETERSON; SCHWARZ; LI; LI *et al.*, 2009), assim como o tabagismo e o consumo de canabis (QIAN; GURLEY; MARKOWITZ, 2019), o uso de fármacos como omeprazol (HAN; OUYANG; CHEN; SHU *et al.*, 2002), contraceptivos orais e o alto consumo de cafeína (DJORDJEVIC; GHOTBI; JANKOVIC; AKLILLU, 2010). Em contrapartida, vegetais da classe das apiáceas como a cenoura, o aipo, a erva doce e a salsa a inibem (PETERSON; SCHWARZ; LI; LI *et al.*, 2009), além do polifenol quercetina (XIAO; HUANG; PENG; TAN *et al.*, 2014). As oscilações que ocorrem naturalmente durante o ciclo menstrual também parecem influenciar a indução da enzima, com uma redução durante a fase

lútea (LANE; STEEGE; RUPP; KUHN, 1992). Atualmente há um grande corpo de evidência apontando uma grande influência dos genes sobre a indução desta enzima, em particular sobre o polimorfismo de nucleotídeo simples CYP1A2 -163 A>C, influenciando a expressão da enzima.

Figura 2. Consumo e metabolização da cafeína em seus metabólitos primários paraxantina, teobromina e teofilina.



Fonte: Figura adaptada e traduzida de Barreto et al. (2021).

2.2 Efeitos da cafeína

2.2.1 Mecanismos

Grandes quantidades de receptores de adenosina tipo A_{2A} podem ser encontradas no sistema nervoso central, principalmente no globo paleoestriado e no núcleo accumbens

(FREDHOLM; AP; JACOBSON; KLOTZ *et al.*, 2001) formando um complexo com os receptores de dopamina de tipo d2. Neste complexo, as ações destes receptores são mutuamente antagonistas, isto é, na presença de adenosina, os receptores A2A reduzem as respostas dos receptores d2, inibindo o sistema de ativação comportamental. No entanto, quando em contato com antagonistas de receptores de adenosina como a cafeína, um aumento na sensibilidade dos receptores dopaminérgicos ocorre, gerando maiores estímulos ao sistema de ativação comportamental, e a um consequente aumento da volição (SALAMONE; CORREA; RANDALL; NUNES *et al.*, 2013). Aumentos nas concentrações de adenosina estão também relacionados com a redução da excitação do sistema nervoso central e com a indução do sono. Os receptores de adenosina a1 e A2A, quando ativados por agonistas, provocam reduções na liberação de histamina no córtex frontal e aumentos na liberação do neurotransmissor GABA, um sedativo (LAZARUS; OISHI; BJORNESS; GREENE, 2019). Quando inibidos pelas xantinas, estes receptores prolongam a capacidade de manter o estado de alerta e vigília, prevenindo ou mitigando os efeitos deletérios da privação do sono sobre a performance cognitiva (PORKKA-HEISKANEN, 2011). A adenosina também participa dos processos relacionados à transdução de sinais de nocicepção ao sistema nervoso central (SAWYNOK, 2013). Desta forma, antagonistas de receptores de adenosina como as metilxantinas têm a capacidade de aumentar a tolerância à dor (FREDHOLM; BÄTTIG; HOLMÉN; NEHLIG *et al.*, 1999).

Ademais, observa-se que após a administração sistêmica de cafeína, ou outro antagonista de receptores de adenosina, um grande aumento nas concentrações de adrenalina ocorre. Nos neurônios pré-sinápticos, a adenosina tem a função de regular a liberação de noradrenalina para as fendas sinápticas e, quando antagonizada, induzem maior respostas do sistema nervoso simpático (FREDHOLM, 2013). A adrenalina e a noradrenalina são os principais hormônios/neurotransmissores responsáveis pelas respostas de luta ou fuga (BURRAGE; MARSHALL; SANTANAM; CHANTLER, 2018) e, quando aumentados, causam maior sensação de alerta, um aumento da prontidão para realizar tarefas, redução da percepção de esforço e da dor (DAVIS; ZHAO; STOCK; MEHL *et al.*, 2003). A ativação deste traço evolutivo pode auxiliar na melhora do desempenho esportivo. Entretanto, estes efeitos, que podem ser considerados positivos em alguns cenários, podem se tornar indesejados quando em intensidades muito altas. Em altas concentrações podem evocar períodos de agitação psicomotora, fala e pensamentos acelerados, insônia, ansiedade, nervosismo, alterações no sistema digestivo e cardiovascular, aumento da diurese, entre outros. Além disto, indivíduos

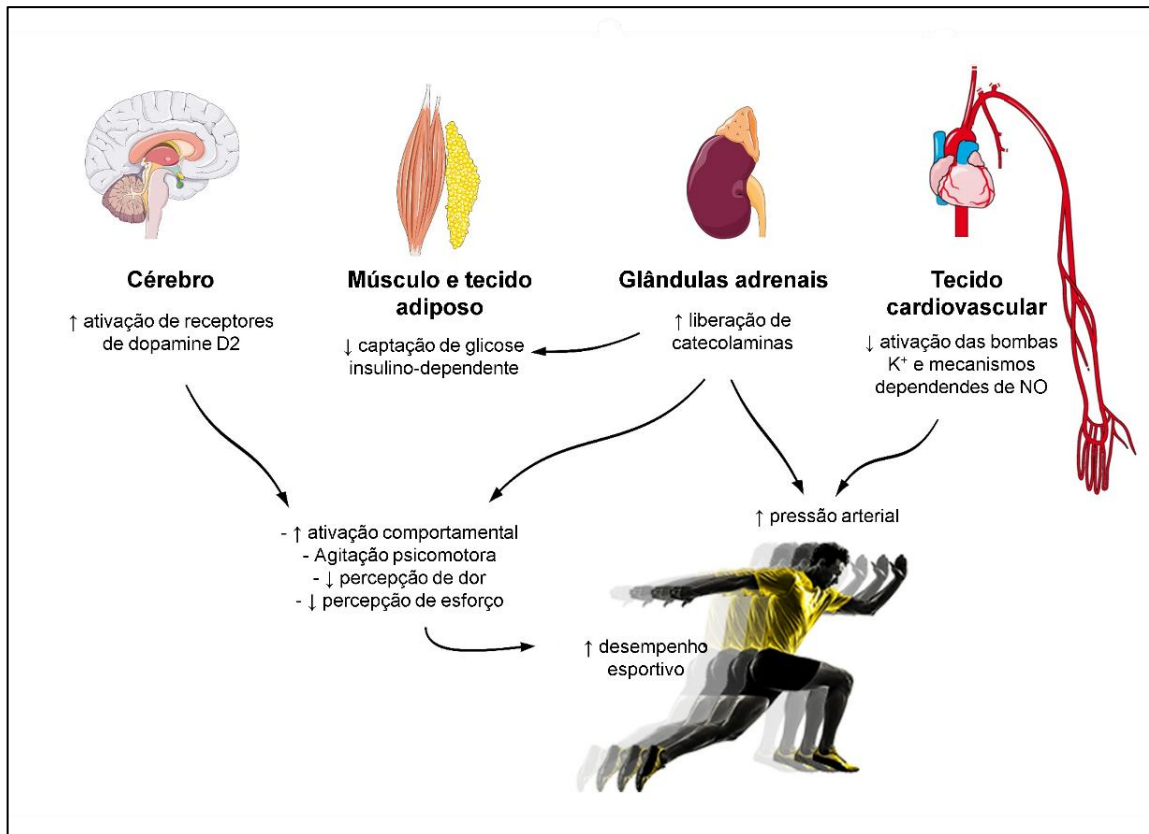
habituaados ao alto consumo de cafeína estão suscetíveis à ocorrência de síndrome de abstinência, causando dores de cabeça, irritabilidade, fadiga e dificuldades de concentração (TEMPLE; BERNARD; LIPSHULTZ; CZACHOR *et al.*, 2017).

Os receptores de adenosina também estão em grande concentração no endotélio vascular, corpo carotídeo, tecido adiposo e músculo esquelético, locais onde regulam os padrões hemodinâmicos e metabólicos. Na vasculatura periférica, a ativação de receptores de adenosina A2A causa um efeito vasodilatador local que se sobrepõe à ação vasoconstritora desencadeada pelos receptores α_1 (RIKSEN; SMITS; RONGEN, 2011). Teoriza-se que os efeitos da adenosina na vasculatura de tecidos vitais como o cardíaco, cerebral e visceral sirvam como proteção contra eventos isquêmicos severos (PARK; GUPTA, 2013). Em oposição, a ação da adenosina sobre os receptores A2A localizados no corpo carotídeo – um quimiossensor responsável por regular as concentrações de oxigênio, gás carbônico e pH – causa hiperventilação, aumento da frequência cardíaca e vasoconstrição devido a um aumento da atividade simpática (CONDE; OBESO; VICARIO; RIGUAL *et al.*, 2006). No músculo esquelético, os receptores de adenosina de tipo α_1 estão relacionados à expressão e translocação de GLUT4 para as membranas celulares. Quando inibidos por um antagonista, uma redução de até 30% na disposição de glicose pode ocorrer, o que pode se caracterizar como perda de sensibilidade à insulina (SACRAMENTO; RIBEIRO; YUBERO; MELO *et al.*, 2015). Apesar de o aumento das concentrações de catecolaminas secundárias ao consumo de cafeína aumentarem a translocação dos transportadores de GLUT4, quando concomitante a hiperinsulinemia, a captação de glicose insulínica independente fica comprometida (HAN; BONEN, 1998). No tecido adiposo, a ativação dos receptores de tipo α_1 causa uma redução na lipólise, levando a uma menor liberação de ácidos graxos para subsequente utilização em outros sítios. A ação sistêmica de um antagonista como a cafeína leva a aumentos na lipólise diretamente através dos receptores α_1 , assim como indiretamente pelo aumento das concentrações de adrenalina e noradrenalina (BEAUDOIN; GRAHAM, 2011).

Sendo o exercício um período de alta demanda energética, durante sua execução ocorre um aumento na produção e liberação de adenosina que, em altas concentrações, acelera o processo de fadiga que geralmente ocorre naturalmente ao longo dos períodos de vigília (SHRYOCK; BELARDINELLI, 1997). De fato, parece interessante para o desempenho esportivo consumir substâncias que se contraponham às ações sistêmicas da adenosina, principalmente no sistema nervoso central, como por exemplo, a cafeína (Figura 3). Seus efeitos estimulantes fazem com que seja uma das substâncias mais consumidas no mundo (KEISLER;

ARMSEY, 2006) e seu consumo agudo parece oferecer vantagens reais em diversas modalidades esportivas de características diferentes (GRGIC; GRGIC; PICKERING; SCHOENFELD *et al.*, 2019).

Figura 3. Sítios em que a cafeína pode atuar na melhora do desempenho esportivo e causar outras alterações fisiológicas.



Fonte: Figura adaptada e traduzida de Barreto *et al.* (2021).

2.2.2 Cafeína no esporte

A cafeína foi incluída no Consenso do Comitê Olímpico Internacional (COI) de 2018 como uma das poucas substâncias com boa evidência de causar algum efeito ergogênico na prática esportiva (MAUGHAN; BURKE; DVORAK; LARSON-MEYER *et al.*, 2018). Por algum tempo, a cafeína também figurou entre as substâncias banidas pelo COI, sendo retirada deste grupo em 2004, tendo as concentrações plasmáticas de atletas em competição aumentado significativamente desde então (AGUILAR-NAVARRO; MUNOZ; SALINERO; MUNOZ-GUERRA *et al.*, 2019). Inicialmente, acreditava-se que estes efeitos ocorriam através da inibição da enzima fosfodiesterase pela cafeína, o que poderia aumentar a oxidação de lipídios

e, deste modo, poupar glicogênio, levando a um prolongamento da capacidade de realizar esforços (TARNOPOLSKY, 1994). Também, alguma evidência apontava para, na presença de cafeína, a ocorrência de um aumento na capacidade de liberação de Ca^{++} do retículo endoplasmático, além de uma maior sensibilidade miofibrilar ao cálcio, aumentando a eficiência das contrações musculares (DODD; HERB; POWERS, 1993). Entretanto, seus efeitos ergogênicos devem-se principalmente por sua capacidade de antagonizar, no sistema nervoso central, os receptores de adenosina de tipo A_{2A}, reduzindo a percepção de esforço, a fadiga e a dor, enquanto aumenta a capacidade de foco (DAVIS; ZHAO; STOCK; MEHL *et al.*, 2003) (Figura3).

Há uma quantidade significativa de dados experimentais e meta-analíticos demonstrando a efetividade da cafeína como um recurso ergogênico em atividades físicas de características diversas. A suplementação parece ser efetiva em atividades em que predomina a força e potência (GRGIC; TREXLER; LAZINICA; PEDISIC, 2018), em atividades de longa duração e de baixa a moderada intensidade (SOUTHWARD; RUTHERFURD-MARKWICK; ALI, 2018), em esportes coletivos (SALINERO; LARA; DEL COSO, 2019) e no exercício resistido (GRGIC; MIKULIC; SCHOENFELD; BISHOP *et al.*, 2019). Contudo, uma revisão guarda-chuva apontou que o efeito da suplementação de cafeína parece ser maior em atividades de *endurance* em relação a atividades de alta intensidade ou de força (GRGIC; GRGIC; PICKERING; SCHOENFELD *et al.*, 2019). De fato, atletas de modalidades *endurance* de nível olímpico parecem consumir mais cafeína em comparação a atletas de modalidades de força ou de alta intensidade, sendo os ciclistas aqueles com maior consumo de cafeína dentre eles (AGUILAR-NAVARRO; MUNOZ; SALINERO; MUNOZ-GUERRA *et al.*, 2019). Ciclistas podem enfrentar tanto provas longas de até 300 km, caracterizadas como predominantemente de *endurance*, mas permeadas por períodos de alta intensidade, quanto contrarrelógios curtos de 3 km (JEUKENDRUP; CRAIG; HAWLEY, 2000). Há evidência para a eficácia da cafeína como suplemento ergogênico tanto em tiros de curta duração e alta intensidade (GRGIC, 2018) e em provas curtas como o 1 km em Omnia (WILES; COLEMAN; TEGERDINE; SWAINE, 2006) e contrarrelógios de 4 km (SANTOS RDE; KISS; SILVA-CAVALCANTE; CORREIA-OLIVEIRA *et al.*, 2013), como também em provas de longa duração e média ou baixa intensidade, maiores que 10 km (ASTORINO; COTTRELL; TALHAMI LOZANO; ABURTO-PRATT *et al.*, 2012; FOAD; BEEDIE; COLEMAN, 2008; SAUNDERS; DE OLIVEIRA; DA SILVA; DE SALLES PAINELLI *et al.*, 2016). Isto demonstra a eficácia da

caféina em melhorar o desempenho tanto em atividades predominantemente anaeróbias, quanto em atividades que dependem em maior proporção do metabolismo aeróbio.

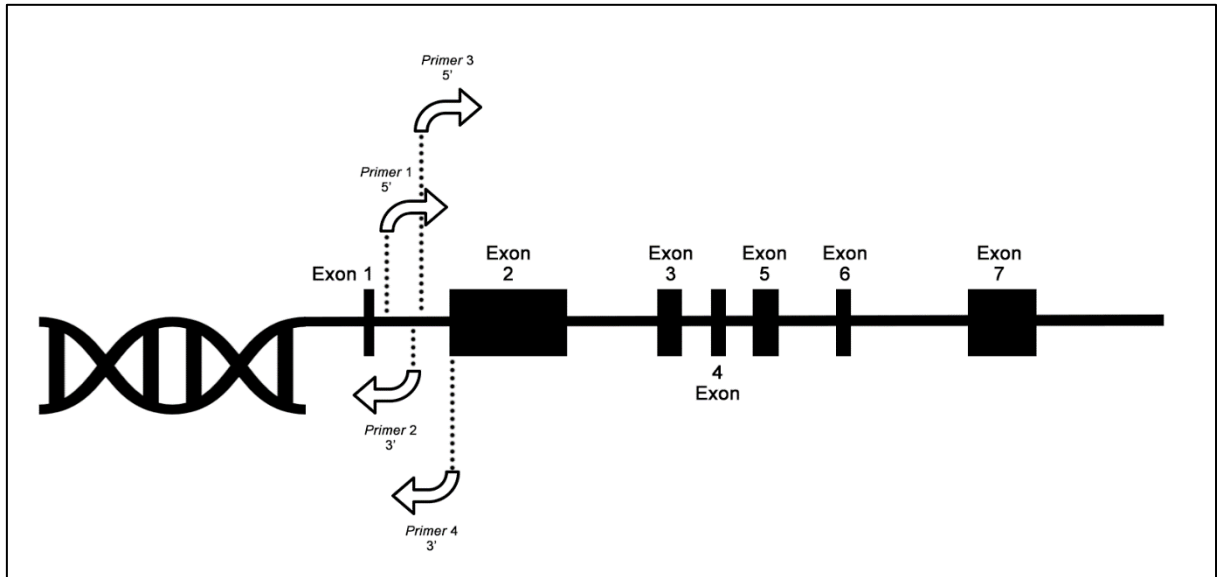
Apesar de seu uso disseminado e abundante evidência, alguns estudos agudos falharam em encontrar benefícios da suplementação na prática esportiva (HUNTER; ST CLAIR GIBSON; COLLINS; LAMBERT *et al.*, 2002; MARQUES; JESUS; GIGLIO; MARINI *et al.*, 2018; SKINNER; JENKINS; COOMBES; TAAFFE *et al.*, 2010). Vários podem ser os fatores responsáveis pela existência de variabilidade interindividual na resposta à suplementação de caféina. Estudos recentes têm explorado a hipótese de que grande parte desta variabilidade pode estar relacionada ao polimorfismo de nucleotídeo simples CYP1A2 -163 A>C (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021), que afeta o gene responsável por expressar a enzima citocromo p450 1A2, a principal metabolizadora de caféina em humanos (ARNAUD, 2011). Contudo, ainda há controvérsia em relação ao real papel deste polimorfismo em moderar os efeitos agudos da caféina.

2.3 CYP1A2 -164 A>C

2.3.1 Visão geral

Este polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) consiste em uma troca de uma base C por A na posição 734 do gene (Figura 4) em seu primeiro íntron, uma região não codificante do gene da enzima CYP1A2 (SACHSE; BROCKMOLLER; BAUER; ROOTS, 1999). Ele parece afetar negativamente a expressão da enzima, criando três genótipos na seguinte distribuição aproximada da população: homozigotos AA, 45%; heterozigotos AC, 45%; e homozigotos CC, 10%; distribuição que se esperaria dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Como este SNP se dá em uma região não codificante do gene, pode-se especular que sua principal implicação seja a redução na expressão da enzima, não causando prejuízos a sua funcionalidade. As implicações deste SNP estão mais relacionadas, portanto, com a velocidade de metabolização da caféina, o que sugere a existência de três fenótipos: 1) metabolizadores rápidos (AA); 2) metabolizadores intermediários (AC) e 3) metabolizadores lentos (CC)(SACHSE; BROCKMOLLER; BAUER; ROOTS, 1999). De fato, parece haver diferenças na velocidade de metabolização de substratos da enzima entre os genótipos, sendo os carreadores do alelo C metabolizadores mais lentos que os homozigotos AA (CASTORENA-TORRES; MENDOZA-CANTU; DE LEON; CISNEROS *et al.*, 2005; SACHSE; BROCKMOLLER; BAUER; ROOTS, 1999).

Figura 4. A estrutura do gene CYP1A2. Os íntrons estão representados como linhas horizontais e os exons como linhas verticais e caixas. As flechas são as posições dos primers para a identificação e início do sequenciamento.



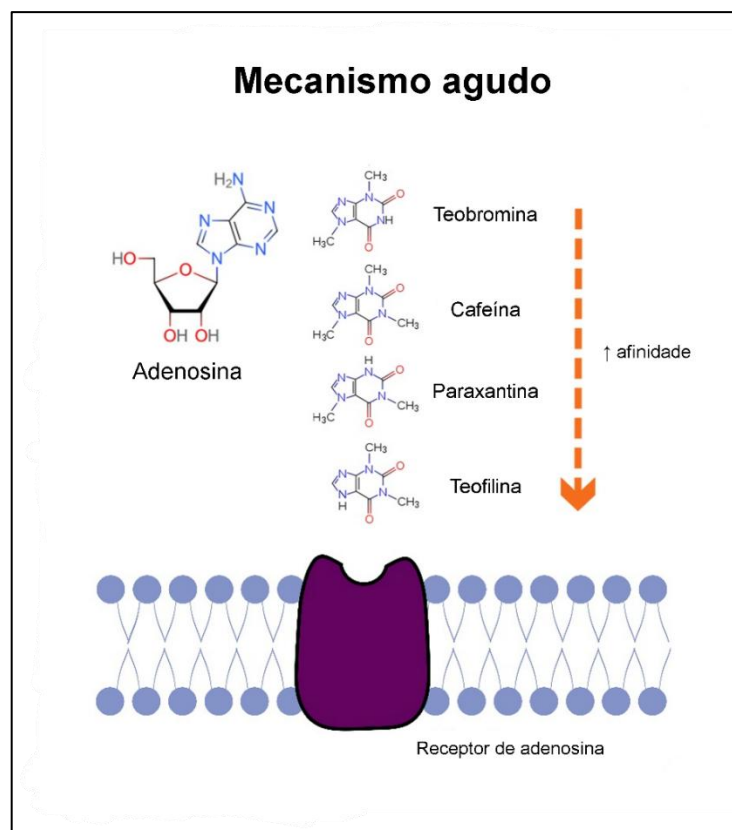
Fonte: Figura adaptada e traduzida de Barreto et al. (2021).

Estas diferenças se dariam através de uma diminuição da disponibilidade enzimática. A enzima CYP1A2 satura, em média, com doses entre 1-4 mg/kg de peso corporal de cafeína (ARNAUD, 2011), ponto em que alcança sua velocidade máxima de catálise (V_{max}). Sendo provável que a metabolização da cafeína pela CYP1A2 siga uma cinética similar à de Michaelis-Menten, espera-se que, reduzida a disponibilidade enzimática, como é o caso dos carreadores do alelo C, uma diminuição da velocidade de metabolização para a mesma concentração de substrato (cafeína) ocorra, mas sem alterar a constante K_m ou a concentração para atingir a V_{max} . Isto significa que, quanto maior a potencial V_{max} atingida, mais rápida seria a transformação da cafeína em seus metabólitos, reduzindo sua meia vida e o tempo de *washout*. Seus metabólitos, em contrapartida, apesar de também serem metabolizados pela CYP1A2, contam com a participação também das enzimas CYP2A6, N-acetiltransferase-2 e xantina oxidase. Em consequência, assumem uma cinética diferente da Michaelis-Menten, *i.e.*, quanto maior sua concentração plasmática, maior a velocidade de metabolização (NEHLIG, 2018), não sendo afetados tão gravemente pelo SNP.

A importância hipotética das diferenças na velocidade de metabolização da cafeína advém das diferenças na afinidade de seus metabólitos para com os receptores de adenosina (Figura 5). Algumas das dimetilxantinas apresentam maior afinidade com os receptores que a

própria cafeína, sendo a teofilina aquela com maior afinidade, seguida pela paraxantina, a cafeína e finalmente a teobromina (DALY; BUTTS-LAMB; PADGETT, 1983). Ao que parece, a paraxantina exerce seus efeitos fisiológicos em similar magnitude à cafeína sobre a pressão arterial, lipólise e liberação de catecolaminas, mesmo em concentrações plasmáticas menores (BENOWITZ; JACOB; MAYAN; DENARO, 1995). Sendo a paraxantina o principal produto do metabolismo da cafeína (cerca de 80% do total) (GU; GONZALEZ; KALOW; TANG, 1992), espera-se que quanto mais rápida a conversão da cafeína a paraxantina, mais rápido e intenso deve ser o efeito causado pelo seu consumo, incluindo seus efeitos sobre o desempenho esportivo.

Figura 5. A cafeína e seus metabólitos são inibidores não-seletivos de receptores de adenosina. Alguns metabólitos têm maior afinidade com os receptores que a própria cafeína. Figura adaptada e traduzida de Barreto et al. (2021).



Fonte: Figura adaptada e traduzida de Barreto et al. (2021).

2.3.2 Implicações no esporte

O primeiro estudo a investigar a influência dos genótipos CYP1A2 sobre os efeitos ergogênicos da suplementação de cafeína testou ciclistas do sexo masculino recreativamente

competitivos durante um contrarrelógio simulado de ciclismo de 40 km (WOMACK; SAUNDERS; BECHTEL; BOLTON *et al.*, 2012). Neste caso, ambos os genótipos obtiveram melhora significativa de desempenho, mas em maior magnitude para os homozigotos AA (+4,9%, $p < 0,0001$) em comparação com os carreadores do alelo C (+1,8%, $p = 0,04$). De maneira similar, outros estudos puderam observar uma melhor resposta à suplementação em homozigotos AA no desempenho em treinamento resistido (RAHIMI, 2019) e na prática do basquetebol em nível de elite (PUENTE; ABIAN-VICEN; DEL COSO; LARA *et al.*, 2018). O estudo de PATAKY; WOMACK; SAUNDERS; GOFFE *et al.* (2016), por sua vez, obteve resultados na direção contrária, ou seja, demonstrando um maior benefício para carreadores do alelo C em comparação com homozigotos AA após a suplementação aguda com cafeína. A maior parte dos estudos publicados até o momento, entretanto, não conseguiu demonstrar qualquer influência do genótipo sobre o desempenho após a suplementação (CARSWELL; HOWLAND; MARTINEZ-GONZALEZ; BARON *et al.*, 2020; COURTNEY S. KLEIN, 2012; GIERSCH; BOYETT; HARGENS; LUDEN *et al.*, 2018; GLAISTER; CHOPRA; DE SENA; STERNBACH *et al.*, 2021; GRGIC; PICKERING; BISHOP; SCHOENFELD *et al.*, 2020; MUNOZ; LOPEZ-SAMANES; AGUILAR-NAVARRO; VARILLAS-DELGADO *et al.*, 2020; SALINERO; LARA; RUIZ-VICENTE; ARECES *et al.*, 2017), tornando a compreensão da evidência ainda mais dificultosa.

Grande parte dos resultados publicados até o momento foi obtida de estudos com tamanhos pequenos de amostra, o que não permitiram a separação dos genótipos AC e CC nas análises, já que se estima que apenas 10% da população seja formada por homozigotos CC (SACHSE; BROCKMOLLER; BAUER; ROOTS, 1999). Isto se torna particularmente importante ao avaliarmos os resultados do estudo de GUEST; COREY; VESCOVI e EL-SOHEMY (2018). Com tamanho amostral mais numeroso ($n = 101$ atletas), seu trabalho pôde separar os participantes homozigotos CC ($n = 8$) dos heterozigotos AC. De maneira inédita, demonstrou-se uma piora do desempenho em indivíduos CC de 13,7% após uma dose moderada de cafeína (4 mg/kg), sem efeitos demonstrados para a dose baixa (2 mg/kg) em um contrarrelógio de 10km de ciclismo. Em contraste, indivíduos homozigotos AA obtinham uma melhora de +6,8 e +4,8% nas mesmas doses, enquanto o desempenho dos heterozigotos AC não mudava após a suplementação. Mesmo com os resultados inéditos e surpreendentes, é necessário cautela ao extrapolar seus resultados. Mesmo os autores tendo realizado análises de sensibilidade na tentativa de corrigir possíveis erros metodológicos, a ausência de

familiarização, principalmente devido à heterogeneidade da população (atletas de modalidades diversas), pode ter afetado os resultados.

Outros dois *reports* foram publicados com dados provenientes deste mesmo desenho experimental, mas com desfechos de testes físicos diferentes (SICOVA; GUEST; TYRRELL; EL-SOHEMY, 2021; WONG; MARSHALL; SICOVA; GUEST *et al.*, 2021). Resultados na mesma direção dos encontrados na publicação original (GUEST; COREY; VESCOVI; EL-SOHEMY, 2018) foram observados para força de pressão palmar (WONG; MARSHALL; SICOVA; GUEST *et al.*, 2021), ou seja, uma redução na performance para homozigotos CC, sem mudanças para os outros genótipos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada no teste de salto vertical (WONG; MARSHALL; SICOVA; GUEST *et al.*, 2021) ou no teste de Wingate (SICOVA; GUEST; TYRRELL; EL-SOHEMY, 2021), porém com tamanhos de efeito negativos em indivíduos de genótipo CC, variando entre -0,55 e -0,70. Em razão de estes resultados serem provenientes do mesmo estudo, com o mesmo desenho experimental e terem sido obtidos nas mesmas visitas, os mesmos vieses dos resultados inicialmente publicados por GUEST; COREY; VESCOVI e EL-SOHEMY (2018) se aplicam (i.e., ausência de familiarização, amostra heterogênea). Deste modo, o fato das diferenças implausíveis relatadas em WONG; MARSHALL; SICOVA; GUEST *et al.* (2021) também causam preocupação em GUEST; COREY; VESCOVI e EL-SOHEMY (2018) e SICOVA; GUEST; TYRRELL e EL-SOHEMY (2021). No primeiro caso, as diferenças de 30-35 kgf de força de prensão palmar reportadas se comparam às diferenças entre atletas de judô altamente treinados e homens maiores de 80 anos de idade (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; SAUNDERS, 2022). Sendo assim, apesar da multiplicidade de publicações, devem ser considerados como uma evidência única, e os mesmos cuidados em sua interpretação e extrapolação devem ser tomados.

Outro estudo de tamanho amostral igualmente grande realizado por Spinel e colaboradores (2020) reuniu uma amostra de 100 atletas adolescentes treinados em futebol, voleibol e atletismo. Estes foram submetidos a testes de força (flexão de braço e abdominais *sit-up*), potência (salto de contramovimento e salto *spike*), *endurance* (Yo-Yo IR1) e agilidade (teste de agilidade em corrida) e, importantemente, foram familiarizados a estes protocolos de exercício em uma visita anterior aos testes. Em contraste aos estudos de Guest (GUEST; COREY; VESCOVI; EL-SOHEMY, 2018), Wong (WONG; MARSHALL; SICOVA; GUEST *et al.*, 2021) e Sicova (SICOVA; GUEST; TYRRELL; EL-SOHEMY, 2021), apesar da dose de cafeína de 6 mg/kg de peso corporal ter sido eficaz em melhorar o desempenho nos testes de

flexão de braço, abdominais até a exaustão e do teste Yo-Yo IR1, nenhuma influência do genótipo CYP1A2 foi observada.

Levando em conta a totalidade da evidência existente, ainda não é possível afirmar categoricamente que existe um impacto do polimorfismo CYP1A2 -164 A>C sobre o efeito agudo da cafeína. Há indícios, contudo, de que os homozigotos AA estão mais propensos a obter benefícios da suplementação de cafeína como recurso ergogênico, mas a maioria dos estudos obtiveram um tamanho amostral pequeno e amostras heterogêneas. Em meta-análise recente, foi demonstrada pequena melhora de desempenho para homozigotos AA (*effect size*: 0,30; IC 95% 0,21; 0,39); muito pequena para heterozigotos AC (*effect size*: 0,16; IC 95% 0,06; 0,25) e uma perda de desempenho de tamanho pequeno para homozigotos CC (*effect size*: -0,22; IC 95% -0,44; -0,01) (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024). Todavia, a presença de falhas metodológicas importantes nos estudos existentes e de uma possível influência de conflitos de interesse afetam seriamente a robustez da evidência. No mesmo trabalho (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024), quando excluídos estudos que reportaram conflitos de interesse e aqueles com falhas metodológicas sérias, nenhuma diferença entre os genótipos foi observada.

Dos poucos estudos que reportaram medidas sanguíneas, apenas um encontrou resultados significantes. No trabalho de GIERSCH; BOYETT; HARGENS; LUDEN *et al.* (2018), uma diferença nas concentrações de cafeína foi encontrada entre os genótipos, com valores maiores para os carreadores do alelo C após 60 minutos da ingestão de uma dose de 6 mg/kg de cafeína. Com doses similares, de 5 mg/kg, MCGRATH (2015) reporta em sua dissertação de mestrado um aparente efeito simples dos genótipos CYP1A2 na relação paraxantina:cafeína que os testes de hipóteses falharam em detectar ($n = 11$, $p = 0,09$). Em ambos os estudos (GIERSCH; BOYETT; HARGENS; LUDEN *et al.*, 2018; MCGRATH, 2015), contudo, nenhuma diferença foi detectada entre os genótipos para a relação paraxantina:cafeína ou uma correlação entre estas diferenças e melhoras no desempenho físico. Outros estudos não encontraram diferenças entre os genótipos para medidas sanguíneas de metilxantinas após doses de ~3 mg/kg (ALGRAIN; THOMAS; CARRILLO; RYAN *et al.*, 2016; CARSWELL; HOWLAND; MARTINEZ-GONZALEZ; BARON *et al.*, 2020) e 6 mg/kg (POTGIETER, 2013).

Em suma, mais estudos devem ser realizados a fim de investigar os efeitos psicofisiológicos relacionados ao consumo de cafeína, correlacionando-os com mudanças no desempenho esportivo.

2.3.3 Interação com outros genes e fatores ambientais

Como especulado anteriormente (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021), quanto mais rápido o aparecimento da paraxantina na corrente sanguínea (metabolização), mais rapidamente seria atingido o efeito máximo da ingestão aguda de cafeína. Na sessão 2.3.1, é detalhado que a metabolização da cafeína segue uma cinética similar à descrita por Michaelis-Menten e, sendo assim, diferenças na disponibilidade enzimática modificariam a velocidade máxima de metabolização (V_{max}), mas não a concentração necessária para atingi-la, que se mantém constante (NEHLIG, 2018). Deste modo, em doses mais altas (que causem o alcance de concentrações maiores), pode-se teorizar que metabolizadores rápidos (homozigotos AA) atingirão concentrações mais altas de paraxantinas e, conseqüentemente, efeitos fisiológicos mais intensos, mais rapidamente.

É ainda possível que os indivíduos com menor disponibilidade enzimática (carreadores do alelo C) eventualmente atinjam as mesmas concentrações de cafeína e metabólitos que seus pares metabolizadores rápidos, mas em um ponto mais distante no tempo (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021). Assim, pode-se presumir que indivíduos carreadores do alelo C precisam de intervalos maiores entre a suplementação e o exercício físico para atingir seus efeitos máximos. Há pouca evidência sobre a interação entre dose e *timing* da suplementação de cafeína e genótipos CYP1A2 e, desta evidência, grande parte vem de estudos que não avaliaram estes fatores diretamente. Uma meta-análise publicada recentemente (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024), em congruência ao que foi hipotetizado em revisão narrativa anterior (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021), demonstrou que os indivíduos homozigotos CC são os únicos que sofreriam a influência do *timing* e da dose de cafeína na realização de testes físicos. Apesar de esta meta-análise ter sugerido que os homozigotos CC podem de fato obter maiores benefícios com maior intervalo entre suplementação e exercício, observou também que as diferenças entre os genótipos eram menores em doses mais altas (mais próximas de 6 mg/kg). É necessário cautela, contudo, ao atingir doses agudas de cafeína mais próximas e superiores às sugeridas em BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.* (2024), já que isto pode aumentar o risco de

sintomas indesejáveis como ansiedade, dores de cabeça, agitação e insônia (MAUGHAN; BURKE; DVORAK; LARSON-MEYER *et al.*, 2018). Caso ocorram em intensidades muito altas, pode-se esperar que estes efeitos indesejáveis causem uma redução no desempenho físico, ao invés de seu desejado efeito ergogênico. Ademais, não há, até o momento, evidência de interação entre o polimorfismo CYP1A2 -164 A>C e a ocorrência ou a intensidade dos sintomas indesejáveis secundários ao consumo de cafeína.

Esta relação entre dose, *timing* e genótipo fica ainda mais intrincada em altos níveis de consumo habitual de cafeína, já que este fator parece aumentar a expressão não somente da enzima apenas em metabolizadores rápidos (homozigotos AA) (DJORDJEVIC; GHOTBI; JANKOVIC; AKLILLU, 2010), mas também de receptores de adenosina A2A no sistema nervoso central, afetando sua disponibilidade e funcionalidade (BOULENGER; PATEL; POST; PARMA *et al.*, 1983; CREESE; SIBLEY, 1981). Deste modo, pode-se tornar necessário ingerir doses cada vez mais altas para superar uma possível tolerância à cafeína (LAU; FALK, 1995). Grande parte da evidência a respeito deste tema é proveniente de estudos mecanísticos em animais. Em humanos e no esporte, até o momento, não há consenso a respeito dos impactos da habituação ao consumo de cafeína sobre seus efeitos agudos. Parte da literatura sugere um papel do consumo habitual de cafeína em uma potencial efeito de adaptação em condições controladas, ou seja, quando a ingestão diária é parte integrante do protocolo de pesquisa (BEAUMONT; CORDERY; FUNNELL; MEARS *et al.*, 2017; LARA; RUIZ-MORENO; SALINERO; DEL COSO, 2019). Já em estudos em que o consumo não é controlado, mas avaliado através de questionários e recordatórios, o efeito parece não ser significativo (GONCALVES; PAINELLI; YAMAGUCHI; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Em uma meta-análise mais recente, nenhum efeito da habituação foi encontrado de modo geral (CARVALHO; MARTICORENA; GRECCO; BARRETO *et al.*, 2022), mas um efeito de interação entre genótipos e consumo habitual não pode ser descartado. Sendo assim, um estudo avaliando a interação entre estes dois fatores é de importante realização.

Outra potencial fonte de variabilidade é o ciclo circadiano. A adenosina acumula nos tecidos ao longo do dia e é importante para o início e qualidade do sono (KALINCHUK; MCCARLEY; PORKKA-HEISKANEN; BASHEER, 2011), período em que seus níveis retornam aos níveis basais (BASHEER; STRECKER; THAKKAR; MCCARLEY, 2004). Sendo seu papel importante na regulação da motivação e da atividade neuronal (LAZARUS; OISHI; BJORNESS; GREENE, 2019), concentrações aumentadas de adenosina poderiam reduzir o desempenho esportivo ao longo do dia (ZHENG; HASEGAWA, 2016). Contudo, a

evidência a respeito da influência do horário do dia sobre a performance esportiva e, mais importante, sua interação com o uso da cafeína, é escassa e contrastante (BOYETT; GIERSCH; WOMACK; SAUNDERS *et al.*, 2016; MORA-RODRIGUEZ; PALLARES; LOPEZ-GULLON; LOPEZ-SAMANES *et al.*, 2015; MUNOZ; AGUILAR-NAVARRO; RUIZ-MORENO; VARILLAS-DELGADO *et al.*, 2023), sendo inexistente no caso de uma interação com fatores genéticos.

Apesar da possível influência do SNP CYP1A2 -164 C>A, deve-se compreender que, assim como a grande maioria dos fenótipos humanos, outros fatores genéticos e ambientais podem estar envolvidos na resposta ao consumo agudo de cafeína. Entre os fatores genéticos encontram-se outros polimorfismos em genes relacionados às ações da cafeína, como por exemplo o gene ADORA2A. Este gene expressa os receptores A2A, isto é, o mais importante alvo da cafeína no SNC para seus efeitos psicoativos (DAVIS; ZHAO; STOCK; MEHL *et al.*, 2003). O polimorfismo rs5751876 afeta a expressão dos receptores gerando fenótipos de alta (TT) ou baixa sensibilidade (carreadores do alelo C) à cafeína (CHILDS; HOHOFF; DECKERT; XU *et al.*, 2008). Seu impacto, contudo, parece estar limitado à ocorrência e intensidade dos sintomas psicológicos como ansiedade e agitação (CHILDS; HOHOFF; DECKERT; XU *et al.*, 2008), e parece não afetar o desempenho esportivo pós-suplementação (CARSWELL; HOWLAND; MARTINEZ-GONZALEZ; BARON *et al.*, 2020; CHILDS; HOHOFF; DECKERT; XU *et al.*, 2008; MUNOZ; LOPEZ-SAMANES; AGUILAR-NAVARRO; VARILLAS-DELGADO *et al.*, 2020). Assim como o ADORA2A, um polimorfismo no gene DRD2 (receptores de dopamina tipo D2) também afeta os sintomas da cafeína em humanos (CHILDS; HOHOFF; DECKERT; XU *et al.*, 2008). Entretanto, apenas a tese de mestrado de Sicova (SICOVA, 2021) investigou seu impacto no esporte, sem encontrar efeito significativo. Sendo assim, ainda é necessária a realização de mais estudos investigando o impacto de polimorfismos e variantes genéticas sobre o efeito agudo da cafeína, já que grande parte da literatura envolve apenas os genes CYP1A2 e ADORA2A.

Em suma, muitos são os fatores que podem gerar variabilidade em estudos investigando o efeito da cafeína sobre o desempenho físico. Desde a dose utilizada, o horário do dia em que os testes físicos são realizados, até fatores genéticos como o polimorfismo no gene CYP1A2, além de sua interação com o consumo habitual de cafeína. Ainda é necessária a realização de estudos que controlem ou pelo menos mensurem estes múltiplos fatores com fim de ao menos reduzir o impacto desta variabilidade nos modelos estatísticos aplicados. Deste modo

poderemos observar com menos ruídos e mais precisão os efeitos dos genótipos CYP1A2 sobre o efeito agudo da cafeína no desempenho físico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar a influência do polimorfismo de nucleotídeo simples CYP1A2 -164 A>C sobre as respostas fisiológicas e de desempenho físico à suplementação aguda de cafeína, bem como determinar os fatores que a variabilidade observada nas respostas à sua suplementação.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1 Estudo A

- Determinar as diferenças nas respostas sanguíneas de cafeína e seus metabólitos ao longo do tempo entre indivíduos de diferentes genótipos CYP1A2;
- Observar a influência do polimorfismo CYP1A2 -164 A>C sobre as mudanças na pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca ao longo do tempo, além de sua relação com a concentração de cafeína e seus metabólitos;
- Observar a influência do polimorfismo CYP1A2 -164 A>C sobre a ocorrência e intensidade dos sintomas físicos e psicológicos do consumo de cafeína ao longo do tempo, além de sua relação com a concentração de cafeína e seus metabólitos;

3.2.2 Estudo B

- Verificar a influência do polimorfismo CYP1A2 -164 A>C sobre os efeitos ergogênicos da suplementação de cafeína no desempenho em um contrarrelógio simulado de ciclismo de 4 km após a suplementação de cafeína em doses de 3 e 6 mg/kg;
- Determinar se as diferenças no desempenho em um teste de contrarrelógio de ciclismo de 4 km após a suplementação de cafeína em doses de 3 ou 6 mg/kg têm relação com as concentrações de cafeína e seus metabólitos entre os diferentes genótipos CYP1A2;
- Determinar se há interação entre os genótipos CYP1A2 e outros fatores (consumo habitual de cafeína, horário do dia, dose, a intensidade dos sintomas psicológicos e a expectativa ou cegamento do participante) que possam impactar o efeito da cafeína sobre o desempenho em um teste de contrarrelógio de ciclismo de 4 km.

4. MÉTODOS

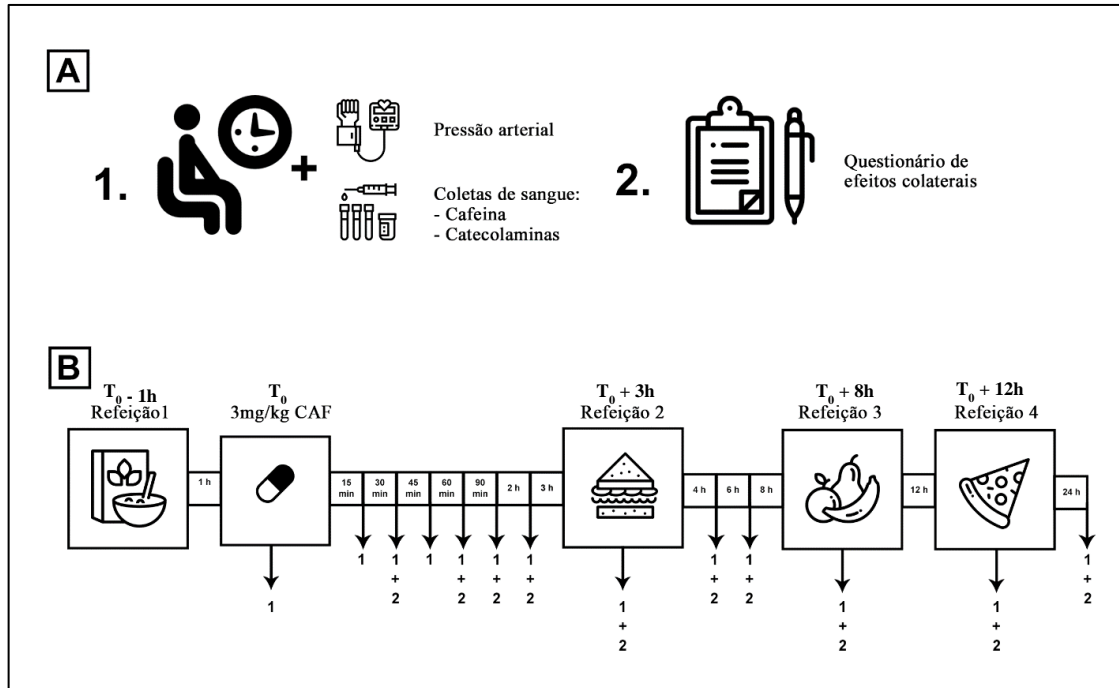
Para que respondamos às perguntas propostas durante este projeto e atinjamos os objetivos descritos, dois estudos foram estabelecidos. O Estudo A avaliou as mudanças nas concentrações plasmáticas de cafeína e seus metabólitos durante o período de 24 horas, durante as quais foram extraídas amostras de sangue para posterior quantificação, medidas de pressão arterial, frequência cardíaca, sintomas físicos e psicológicos. No Estudo B as respostas agudas à suplementação de cafeína no ciclismo foram avaliadas através de um contrarrelógio simulado de 4 km que foi realizado 60 minutos após o consumo de cafeína com doses de 3 e 6 mg/kg. Ambos os estudos avaliaram as diferenças entre os genótipos. Os estudos foram apreciados pelo Comitê de Ética da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (CAAE: 71618417.1.0000.5391) e foram realizados na Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo. Este trabalho fez parte do projeto de Jovem Pesquisador do professor Bryan Saunders e recebeu incentivos financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2016/50438-0), sob sua responsabilidade, além das bolsas de mestrado (2017/15314-1) e doutorado direto (2020/12036-3), sob a responsabilidade do discente Gabriel Barreto.

4.1 Estudo A

4.1.1 Desenho experimental

Trata-se de um estudo agudo, observacional, não cego, que contou com uma visita com duração de 12 horas e avaliação continuada até 24 horas pós consumo da cafeína. Assim, o estudo investigou a influência do SNP CYP1A2 -164 A>C sobre a farmacocinética da cafeína após uma dose de 3 mg/kg de massa corpórea de cafeína durante o período de 24 horas. Foram avaliadas a sua velocidade de transformação em paraxantina, teofilina e teobromina ao longo do tempo, além de sua relação com os efeitos fisiológicos agudos (frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica) e sintomas físicos e psicológicos. Para isto, sangue foi coletado dos participantes em intervalos de tempo pré-estabelecidos para quantificação de cafeína e seus metabólitos. Um questionário de sintomas relacionados ao uso de cafeína foi preenchido pelos participantes a cada tempo de coleta estabelecido, tendo também sua pressão arterial sistólica e diastólica e a frequência cardíaca aferidas. O desenho experimental está descrito na Figura 6.

Figura 6. Procedimentos realizados no estudo A (painel A) e o desenho da visita, com os procedimentos a serem realizados em cada ponto no tempo (painel B).



Fonte: Figura do autor.

4.1.2 Amostra

Foram incluídos neste protocolo indivíduos: 1) do sexo masculino, 2) saudáveis (sem condições de saúde conhecidas), 3) com idade entre 18 e 45 anos. Para este estudo apenas homens foram incluídos objetivando evitar a influência do ciclo menstrual na expressão da enzima CYP1A2. Foram excluídos indivíduos: 1) fumantes, 2) portadores de doenças crônicas, 3) em uso de drogas que fossem metabolizadas pela enzima CYP1A2. O consumo habitual de cafeína não fez parte dos critérios de inclusão ou exclusão, mas foi registrado para análises posteriores (descritas na sessão 4.3.1).

O cálculo amostral foi realizado no Software RStudio com o tamanho de efeito de 0,40 extraído de meta-análise avaliando a diferença no metabolismo de cafeína entre os genótipos CYP1A2 (KOONRUNGSESOMBOON; KHATSRI; WONGCHOMPOO; TEEKACHUNHATEAN, 2018). Para isto, foram criadas duas amostras aleatórias com distribuição normal: 1) de média padronizada zero (intercepto) e desvio padrão 1, e 2) a amostra 1 somada a um efeito de 0,40 e erro padrão calculado com base nos intervalos de confiança da meta-análise ([limite superior - limite inferior] * 3,92). Este procedimento foi realizado 10.000 vezes para cada tamanho amostral, obtendo então o número mínimo de 42 de indivíduos para

atingir um poder de 80%, considerando um alfa de 5%. Visando os custos financeiros e temporais das análises, decidiu-se por utilizar uma amostra de conveniência, sendo pelo menos 10 indivíduos com genótipo AA e 10 indivíduos carreadores do alelo C.

O recrutamento de participantes se deu verbalmente nos corredores da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, além de através de posteres que eram divulgados pelos pesquisadores responsáveis em suas contas de Instagram (apêndice 1). Aos indivíduos que demonstrassem interesse era questionado: 1) se possuía alguma doença crônica, 2) se era tabagista ou se consumia alguma droga com fins recreativos e 3) se estava naquele período realizando algum tratamento farmacológico. Caso a resposta para todas as perguntas fosse negativa, a visita ao laboratório era agendada.

4.1.3 Caracterização

Na semana que antecedeu a visita principal, os participantes foram pesados em balança digital (Supermedy, Brasil) e sua altura foi medida com um estadiômetro fixo (Balmak, Brasil) no dia da visita. Dois questionários eram então aplicados com fim de avaliar os hábitos dos participantes em relação a seu consumo de cafeína sendo: 1) de frequência de consumo de alimentos fontes de cafeína (QFA-CAFF, sessão 4.3.1) e 2) de sintomas habituais ao consumo de cafeína (Q-HAB, sessão 4.3.2).

4.1.4 Padronização

Foi solicitado aos voluntários que se abstivessem do consumo de álcool e cafeína nas 24 horas que antecederiam as coletas, período em que deviam registrar seu consumo alimentar de 24 horas (para mais informações, vide sessão 4.3.3) com os alimentos ingeridos, horários e porções. Os participantes chegaram ao laboratório em jejum desde a noite anterior (*overnight*) e receberiam refeições padronizadas ao longo do dia das coletas.

4.1.5 Visita principal

Ao chegar ao laboratório pela manhã (07:00 AM), os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, apêndice 2), receberam um desjejum padronizado,

responderam aos questionários QFA-CAFF (apêndice 3) e Q-HAB (apêndice 4) e preencheram o recordatório alimentar de 24 horas (sessão 4.3.3, apêndice 5). Após uma hora do consumo do desjejum, um cateter venoso periférico foi inserido em veia da região antecubital e os voluntários receberam 3 mg/kg de massa corpórea de cafeína anidra (Farmácia Analítica, São Paulo, BR) em cápsulas opacas. Amostras de sangue venoso foram obtidas nos momentos pré-suplementação (T_0), 15, 30, 45, 60 e 90 minutos, e 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas pós T_0 . Dez minutos antes de cada coleta, os participantes eram postos em repouso sentados e sem realizar qualquer atividade. Um questionário de sintomas agudos (vide sessão 4.3.4, apêndice 6), que era similar ao questionário de Q-HAB, foi respondido pelos voluntários e a pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca foram medidos com um esfigmomanômetro digital (HEM-7122, OMRON, Japão) nos tempos de 30, 60 e 90 minutos e 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas pós-suplementação. Os participantes eram orientados a preencher as mudanças nos sintomas, partindo do valor zero (0) em T_0 .

Além do desjejum ($T_0 - 1$ hora), todas as refeições deveriam ser consumidas no laboratório, sendo o almoço após 3 horas da suplementação, seguido por uma refeição leve 8 horas pós T_0 (lanche da tarde) e o jantar após 12 horas. As informações detalhadas das refeições, incluindo seus valores de calorias, quantidades e valor percentual de carboidratos, proteínas e lipídios e seus respectivos horários estão descritos na Tabela 1. Os alimentos escolhidos para fazer parte da dieta padronizada foram selecionados especificamente com fim de não alterar a expressão da enzima CYP1A2.

Durante todo o tempo da visita principal, os participantes estiveram sob supervisão de um dos pesquisadores responsáveis e estavam autorizados apenas a realizar tarefas leves, de preferência sentados. Era permitido ingerir água e ir ao banheiro livremente. Depois deste período, estavam liberados para que retornassem aos seus lares e deveriam comparecer ao laboratório para a coleta final, após 24 horas da suplementação. No período em que estivessem fora do laboratório (noite), os participantes foram orientados a manterem-se em jejum, podendo consumir apenas água, e a não realizar atividades físicas intensas, programadas ou não. Para a coleta de 24 horas, os participantes preenchiam o último questionário de sintomas (Q-HAB), tinham uma amostra de sangue coletado e sua pressão arterial e frequência cardíaca medidos.

Tabela 1. Descrição da dieta oferecida aos voluntários ao longo das 24 horas do Estudo A. T₀, representa o horário de ingestão da cápsula.

Refeição	Alimento	Medida	Quantidade (g ou ml)	CHO (g)	PTN (g)	LPD (g)	Energia (kcal)
Desjejum (T ₀ - 1h)	Biscoito salgado	1 pct	144g	16	1,9	4,4	110
	Barra de cereal	1 und	22g	17	1	1,2	83
	Iogurte de sabor artificial	1 garrafa	170g	26	4,3	3,9	156
	Queijo processado	1 und	17g	0,55	1,5	3,3	38
	Suco de sabor artificial	1 caixa	200ml	23	0	0	94
Almoço (T ₀ + 3h)	Sanduíche de hamburguer com queijo prato	1 und comercial	145g	30	19	16	344
	Suco de sabor artificial	1 caixa	200ml	23	0	0	94
Lanche da tarde (T ₀ + 8h)	Biscoito salgado	1 pct	144g	16	1,9	4,4	110
	Iogurte de sabor artificial	1 garrafa	170g	26	4,3	3,9	156
Jantar (T ₀ + 12h)	Lasanha	1 und comercial	600g	114	50	40	1016
Total (g)				291,6	83,9	77,1	452,6
Total (kcal)				1.166	336	694	2.201
% kcal				53,1	15,3	31,6	100

Legenda: CHO, carboidratos; PTN, proteínas e LPD, lipídios.

Fonte: Elaborada pelo autor com base nos dados obtidos neste trabalho.

4.2 Estudo B – Desempenho físico

4.2.1 Desenho experimental

Este estudo se tratou de um ensaio clínico randomizado, contrabalanceado, duplo-cego e controlado por placebo e controle e investigou o efeito de duas doses de cafeína (3 ou 6 mg/kg de massa corpórea) no desempenho em um teste contrarrelógio de 4 km de ciclismo entre indivíduos de diferentes genótipos para o SNP CYP1A2 -164 A>C. O recrutamento ocorreu continuamente até o final das coletas de dados do estudo (sessão 4.2.2) na tentativa de atingir o tamanho amostral calculado (sessão 4.2.3). Os indivíduos que eram selecionados (critérios de seleção, sessão 4.2.4) e se voluntariavam a participar foram submetidos a sete visitas.

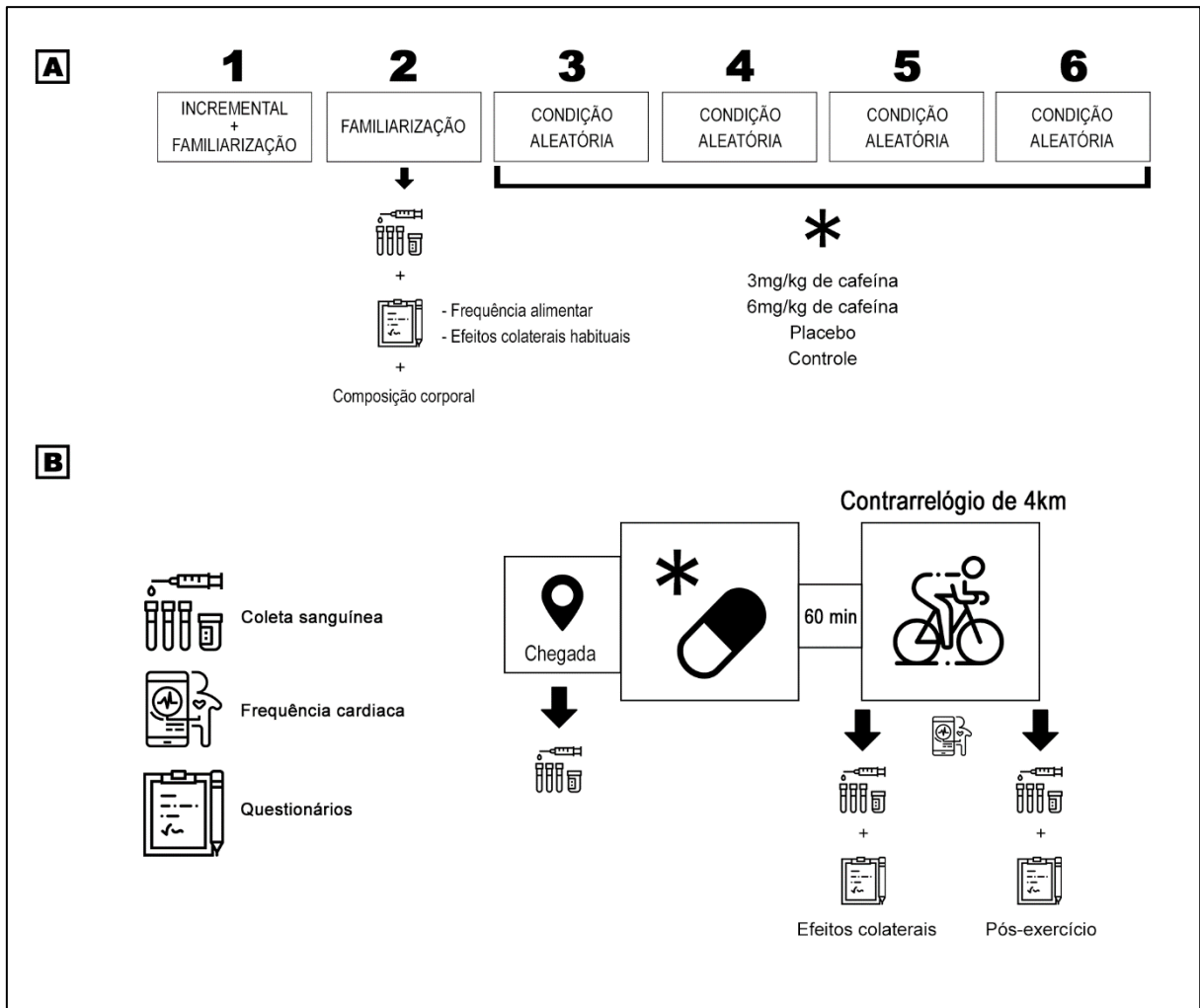
Na primeira visita foram obtidos o consentimento livre e esclarecido (apêndice 2), parte dos dados para caracterização da amostra como peso (Supermedy, Brasil) e altura (Balmak, Brasil), além de valores de VO_2 pico obtidos através do teste incremental (sessão 4.2.5). Também nesta visita foi realizada a primeira de duas sessões de familiarização com o contrarrelógio de 4 km, consistindo na execução do teste de maneira idêntica às sessões principais, com exceção do aquecimento da primeira familiarização (mais informações na sessão do teste de contrarrelógio, sessão 4.2.10). Na segunda visita foram realizadas medidas de dobras cutâneas para estimativa do percentual de gordura (sessão 4.2.6) e uma segunda familiarização com o protocolo. Além disto, nesta visita foram aplicados os questionários QFA-CAFF (sessão 4.3.1, apêndice 3) e o de sintomas habituais ao consumo de cafeína (4.3.2, apêndice 4). Também no segundo dia, os participantes eram orientados a registrar suas dietas em um diário alimentar de 3 dias não consecutivos, sendo dois de semana e um de final de semana para avaliação do consumo alimentar e obtenção de um valor aproximado de consumo de cafeína através de seus alimentos fonte (sessão 4.2.7).

A ordem das visitas principais foi randomizada (sessão 4.2.8) em um delineamento *crossover* contrabalanceado com componentes de grupos paralelos (genótipo), entre cinco condições principais: 1) controle, 2) placebo, 3) 3 mg/kg de cafeína e 4) 6 mg/kg de cafeína (Figura 7). O estudo foi classificado como *quasi-cego* devido à presença de uma condição controle, em que o participante sabe que não está sofrendo uma intervenção.

Para as visitas principais (sessão 4.2.9), visando a padronização dos testes de contrarrelógio de 4 km de ciclismo (sessão 4.2.10), os participantes foram orientados a respeito da necessidade de os testes serem realizados sempre no mesmo período do dia (matutino, vespertino, noturno) para evitar que houvesse um efeito do ciclo circadiano (MORA-RODRIGUEZ; PALLARES; LOPEZ-GULLON; LOPEZ-SAMANES *et al.*, 2015). Era solicitado, também, que mantivessem uma dieta simples, com alimentos convencionais, e que pudesse ser reproduzida nas 24 horas anterior aos testes principais, o que era avaliado através de um recordatório alimentar de 24 horas a ser realizado no início de cada sessão. Além disto, era pedido que evitassem exercícios extenuantes a que não estivessem acostumados, isto é, volumes e intensidade acima do que seria o habitual. Os participantes deveriam se abster do consumo de álcool nas 24 horas anteriores e cafeína apenas nos dias dos testes. O questionário de frequência de consumo de cafeína (sessão 4.3.1, apêndice 3), que cobre grande parte dos alimentos fonte, era utilizado para lembrá-los de quais deveriam não consumir. Por fim, os participantes eram avisados de que deveriam chegar ao laboratório depois de pelo menos 3

horas depois da última refeição para minimizar o efeito do período pós-prandial nas medidas sanguíneas e no exercício. Entre estas visitas deveria haver um intervalo mínimo de 48 horas e máximo de 7 dias.

Figura 7. Desenho experimental do Estudo B, sem incluir a visita relacionada ao Placebo Aberto (painel A) e o esquema logístico das visitas (painel B).



Fonte: Imagem do autor.

4.2.2 Recrutamento

Os participantes foram recrutados através da divulgação de posteres (apêndice 7) nas redes sociais Instagram e Facebook, mais especificamente em grupos e páginas relacionados à prática de ciclismo. Além disso, foi solicitado aos participantes que divulgassem os posteres em grupos de ciclismo no WhatsApp de que fizessem parte. Estes posteres continham informações

pertinentes ao estudo como os critérios de inclusão e a descrição de parte dos procedimentos que seriam realizados. Além disto, ciclistas que participaram de estudos anteriores, ou que estavam participando de outros estudos que ocorriam simultaneamente a este também foram contactados através do aplicativo de mensagens WhatsApp ou via e-mail.

Os indivíduos interessados recebiam informações mais detalhadas sobre o estudo e nove questões padrão indagando: 1) sua idade; 2) se fazia uso de algum suplemento nutricional e, se sim, quais; 3) qual tipo de ciclismo praticava (estrada, triatlon, pista, MTB, etc); 4) tempo de treino (em meses/anos); 5) volume de treino semanal em horas e quilômetros; 6) se era tabagista; 7) se possuía alguma doença crônica; 8) se já havia feito uso de anabolizantes; e 9) se estava fazendo uso de creatina ou beta-alanina e há quanto tempo. As respostas eram tabuladas e então era verificado se o participante se enquadrava nos critérios de elegibilidade. Caso o participante se enquadrasse em algum dos critérios de exclusão, ele era comunicado que não poderia participar do estudo e, caso contrário, uma data para a visita de avaliação inicial era agendada.

4.2.3 Tamanho amostral

Inicialmente, o tamanho amostral almejado foi definido em aproximadamente 100, ou seja, próximo ao que foi atingido por GUEST; COREY; VESCOVI e EL-SOHEMY (2018), para que obtivéssemos um número razoável de indivíduos de genótipo CC. Assim, um cálculo amostral foi realizado no programa RStudio, com simulações tendo como base os tamanhos de efeito (diferenças médias padronizadas) encontrados em uma meta-análise avaliando as diferenças nas respostas de desempenho físico após suplementação de cafeína entre os genótipos CYP1A2 (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024) com a exclusão de trabalhos que reportaram algum conflito de interesses. Para cada grupo amostral testado (n de 50 a 200, acrescidos de 5 em 5), foram criadas 10.000 amostras simuladas com médias seguindo uma distribuição normal padronizada de 0 e desvio padrão 1 em *baseline* para todos os genótipos (valores pré ou placebo). Então, os valores de tamanho de efeito e erro padrão (ou desvio padrão) de 0,316 e 0,239; 0,208 e 0,239; e finalmente 0,069 e 0,470 foram acrescidos aos valores de *baseline* para os homocigotos AAs; heterocigotos ACs e homocigotos CC, respectivamente. Cada uma das amostras simuladas seguia uma distribuição similar à do SNP na população (45% AA, 45% AC e 10% CC). Então, foram realizadas análises de variância de medidas repetidas (RM-ANOVA) para cada amostra simulada com alpha de 0,05. Deste

modo, foi calculado o percentual de valores em que alfa era menor que 0,05; obtendo, então, o valor de beta. Definido o valor mínimo de beta de 80%, o primeiro tamanho amostral a atingi-lo seria o mínimo adequado para reduzir o risco de erro do tipo II. O tamanho amostral mínimo, nestas condições, deveria estar entre 130 e 135 indivíduos. Entretanto, uma amostra de conveniência foi selecionada devido ao custo financeiro e de tempo das análises a serem realizadas para genótipo e concentrações de cafeína e metabólitos.

4.2.4 Critérios de seleção

Foram incluídos neste estudo indivíduos praticantes de ciclismo com idade entre 18 e 45 anos, de ambos os sexos, treinados de acordo com a classificação sugerida por De Pauw *et al.* para homens (DE PAUW; ROELANDS; CHEUNG; DE GEUS *et al.*, 2013) e Decroix *et al.* para mulheres (DECROIX; DE PAUW; FOSTER; MEEUSEN, 2016). Mais especificamente, os participantes deveriam ter valores mínimos de consumo máximo de oxigênio de pelo menos 45 (homens) e 37 ml/kg/min (mulheres), e um volume semanal de treino de no mínimo 60 km/semana, consumidores de cafeína ou não. A amostra de ciclistas treinados foi escolhida devido à maior facilidade de padronização dos testes e visando a redução da heterogeneidade da amostra. Foram excluídos indivíduos: 1) fumantes, 2) portadores de doenças crônicas, 3) em uso de drogas que sejam metabolizadas pela enzima CYP1A2, 4) em uso atual ou pregresso de anabolizantes e 5) aqueles que estiveram em uso de creatina (há menos de 30 dias) ou beta-alanina há pelo menos 6 meses.

4.2.5 Teste Incremental

O teste incremental foi realizado em um ciclo ergômetro (Excalibur Sport, Lode BV, Holanda). A carga inicial foi definida a 50 W para mulheres e 100 W para homens, e foi aumentada 25 W em estágios de 3 minutos até que ocorresse a exaustão voluntária do indivíduo, ou até que a cadência ficasse abaixo de 60 rotações por minuto (rpm). A frequência cardíaca foi aferida durante toda a duração do teste (H7, Polar, Finlândia), e a ventilação por minuto, consumo de oxigênio e quociente respiratório foram mensurados durante o exercício utilizando um analisador de gases *breath-by-breath* (Quark, Cosmed, Itália). Estes dados foram utilizados para determinar o VO_{2pico} , que foi definido pelo valor máximo obtido ao calcular a média do consumo máximo de oxigênio durante 15 segundos.

Um grande encorajamento verbal foi direcionado a cada indivíduo até que o teste terminasse por decisão do próprio ciclista (exaustão voluntária), ou até que ele não conseguisse manter uma cadência de 60 rpm por 5 segundos consecutivos. A potência máxima ($W_{\text{máx}}$) foi definida pela soma da carga do último estágio completado com a fração de tempo do último estágio não-completado, multiplicado por 25W. A cada mudança de estágio, o participante respondia um valor de 6 a 20 (BORG, 1998) para sua percepção subjetiva de esforço (PSE). Para isto, uma tabela era exibida aos participantes com as descrições de cada nível de PSE em cores (anexo 1). Os valores de VO_2 , *respiratory ratio* e potência eram monitorados constantemente através do programa do fabricante (Cosmed Omnia, Itália) em um computador.

4.2.6 Antropometria e Composição corporal

Peso (balança digital Supermedy, Brasil) e altura (antropômetro analógico Balmak, Brasil) foram medidos, além de nove medidas de dobras cutâneas (bíceps, tríceps, peitoral ou tórax, subescapular, supra ilíaca, axilar média, abdominal, quadríceps medial e panturrilha) com um plicômetro clínico Sanny (Sanny, Brasil). Para reduzir o erro, as medidas eram realizadas sempre antes da realização de exercício físico e era solicitado que os participantes evitassem óleos e cremes e que estivessem euhidratados. Para estimativa do percentual de gordura foi utilizado o cálculo de Jackson & Pollock (JACKSON; POLLOCK, 1978), com a utilização de sete dobras, sendo elas tríceps, subescapular, supra ilíaca, abdominal, axilar média, coxa e panturrilha para homens e mulheres. Para o cálculo da densidade corporal foi utilizada uma tabela de Excel (Microsoft Office, Microsoft, Estados Unidos da América) com a seguinte fórmula de acordo com o sexo:

- Homens: $1,112 - (0,00043499 \times \text{Soma7}) + (0,00000055 \times \text{Soma7}^2) - (0,00028826 \times \text{Idade})$
- Mulheres: $1,097 - (0,000423 \times \text{Soma7}) + (0,00000057 \times \text{Soma7}^2) - (0,0000704 \times \text{Idade})$

Para obtenção do percentual de gordura foi utilizada a fórmula: $495/\text{densidade} - 450$.

4.2.7 Avaliação do Consumo Alimentar Habitual

Aos participantes era solicitado o preenchimento de diários alimentares de 3 dias não consecutivos, sendo dois dias durante a semana e um dia de final de semana. Para a obtenção dos diários alimentares, os participantes eram orientados a anotar suas refeições com o máximo de precisão possível, registrando a refeição e o horário em que foi realizada, os alimentos

ingeridos incluindo sua marca comercial quando possível, além do tamanho da porção em gramas ou medidas caseiras. Caso fossem utilizadas medidas caseiras, era necessário detalhar o tipo de utensílio, seu tamanho ou volume, e possíveis variações de quantidade (e.g., xícara de chá pequena cheia). Um avaliador treinado conferia as informações preenchidas no diário alimentar na presença do participante a fim de corrigir possíveis desvios e obter maior precisão. A quantidade de cafeína final era calculada fazendo uso de uma tabela de Excel padronizada, em que os alimentos fontes eram contabilizados. A quantidade em gramas de alimentos fonte consumidos eram multiplicados pelas quantidades de cafeína obtidos em tabelas de composição e artigos em que a concentração de cafeína tenha sido quantificada (ROCHA; LIMA; SAUNDERS; REIS, 2022). Uma tabela de alimentos fonte com suas concentrações de cafeína e as referências utilizadas se encontra no apêndice 8. A soma dos valores obtidos no dia de semana 1 e no dia de semana 2 do diário eram multiplicados por 2,5 (para calcular 5 dias da semana), enquanto os valores do final de semana eram multiplicados por 2 (dois dias de final de semana). Então, a soma de ambos os valores era dividida por 7 (dias da semana) para obter uma média final do total consumido.

4.2.8 Randomização e cegamento

Caso o participante estivesse em conformidade com os critérios de inclusão, os participantes recebiam seu código numérico (de 1 a 103) e suas informações eram enviadas ao pesquisador responsável pela randomização. Esta foi realizada por um pesquisador que não estava diretamente envolvido com as coletas de dados. As ordens aleatórias foram criadas usando um modelo de Quadrado Latino através de um programa *online* gratuito (<https://hamsterandwheel.com/grids/index2d.php>) com o fim de criar um número de ordens balanceadas (4 x 4). Homens e mulheres eram randomizados separadamente. Então, os participantes eram alocados em seus blocos a uma tabela de ordem de sessão com um gerador online de números (<https://www.randomizer.org/>).

Assim que os participantes eram alocados, um dos pesquisadores envolvidos preenchia as cápsulas com a quantidade adequada de cafeína por quilograma de peso do participante, placebo (amido de milho). Para o preparo das cápsulas, um dos pesquisadores responsáveis pesava a maior extremidade da cápsula vazia em balança de precisão AUX320 (Shimadzu, Japão), e então preenchia a cápsula com a quantidade a ser utilizada em cada condição, repetindo a pesagem a cada acréscimo. A variação aceitável foi definida em ± 5 mg. As cápsulas

da intervenção principal eram da cor branca e opacas, não sendo possível identificar o seu conteúdo, ou mesmo sua quantidade. Estas eram, então, colocadas em sacos plástico *ziplock* transparentes identificados com uma fita adesiva branca com o título da intervenção escrito à mão. Na condição controle, apenas um saco plástico transparente vazio era separado e identificado. O pesquisador responsável pela randomização, ou um terceiro pesquisador que não estava envolvido na coleta de dados, realizava a troca do nome da intervenção pela ordem das sessões. Durante as sessões, os avaliadores eram responsáveis pela entrega da intervenção, fosse ela uma cápsula opaca, o placebo aberto ou controle (nenhuma intervenção). Deste modo, os avaliadores estavam cegos apenas para o conteúdo das cápsulas opacas (*quasi-cego*).

4.2.9 Visitas principais

Ao chegar ao laboratório, o participante era questionado a respeito do consumo de cafeína, consumo de álcool e realização de exercícios físicos nas 24 horas anteriores aos testes. Então, uma punção venosa periférica era realizada e um catéter era fixado em veia da região antecubital durante toda a duração do experimento (aproximadamente 1 hora e meia). Doze mililitros de sangue eram coletados para medidas baseline de cafeína e metabólitos em três tubos de 4 mL, sendo um de cor roxa, com EDTA, um de cor verde, com heparina, e um de cor vermelha, seco. Na primeira visita principal, um tubo extra de 4ml com EDTA era colhido para posterior extração de DNA e genotipagem.

Logo após a primeira coleta o participante recebia a intervenção atribuída àquela sessão (ou controle) e ficava em repouso por 60 minutos, sentado, até o início do teste de contrarrelógio. Durante este período, o avaliador preenchia um recordatório alimentar de 24 horas (sessão 4.3.3, apêndice 5). Após 55 minutos, mais três tubos de sangue eram coletados (i.e., 1 EDTA, 1 heparina e 1 seco), além de mais 1-1,5mL de sangue venoso em seringas heparinizadas de 2 ml para obtenção de medidas *baseline* da concentração de lactato em um analisador de gases Stat Profile Prime Plus® (Nova Biomedical, Estados Unidos da América). Um questionário de sintomas agudos (sessão 4.3.4, apêndice 9) similar ao Q-HAB era então preenchido pelo participante apenas nas sessões em que uma cápsula houvesse sido ingerida (3 ou 6 mg/kg de cafeína ou placebo). Sendo assim, nenhum questionário era aplicado na condição controle. Eram iniciados, então, os protocolos necessários para a realização do teste de contrarrelógio de 4 km (sessão 4.2.4).

Finalizado o teste, para as análises pós-exercício, mais três tubos de sangue eram coletados (1 EDTA, 1 heparina e 1 seco) e mais uma seringa para medidas de lactato. Assim como o questionário de sintomas, um questionário pós-exercício era aplicado nas condições de 3 e 6 mg/kg de cafeína e na condição placebo com fim de verificar o sucesso do cegamento (apêndice 10). Neste questionário, era perguntado ao participante: “O que você acha que tomou hoje?”, a que o participante deveria escolher uma entre quatro opções: 1) não sei; 2) cafeína a 3 mg/kg; 3) cafeína a 6 mg/kg ou 4) placebo. Assim que o questionário era preenchido, o participante tinha seu catéter periférico retirado, agendava sua próxima visita e era dispensado. O desenho experimental está representado na Figura 7.

4.2.10 Teste de contrarrelógio de 4 km de ciclismo

Os testes de contrarrelógio de 4 km foram realizados em uma bicicleta de estrada Caloi de tamanho médio (Caloi, Brasil) conectada a um rolo Computrainer (Computrainer Inc., Estados Unidos da América) utilizando um programa de simulação de ciclismo RacermateOne (Computrainer Inc., Estados Unidos da América). Caso os participantes desejassem, ou não fosse possível adaptar a altura do selim da bicicleta padrão, era solicitado que trouxessem suas próprias bicicletas para realização do teste. Neste caso, todos os testes seriam realizados na mesma bicicleta conectada ao rolo Computrainer. O pneu traseiro da bicicleta deveria estar calibrado entre 90 e 100 psi. Uma calibração do rolo era realizada logo antes do aquecimento, que consistia na realização de um *sprint* de 5 segundos até que fosse atingida a velocidade estimada de 40 km/h, de acordo com a leitura do equipamento. A pressão entre o pneu traseiro e o rolo era lida pelo equipamento e o valor deveria estar entre 2,5 e 2,75 lb. Caso o valor obtido estivesse fora desta faixa, um ajuste manual era feito na inclinação do rolo, alterando o contato entre o rolo e o pneu. O procedimento era repetido até que a faixa desejada fosse atingida.

Os participantes realizaram um aquecimento de 10 minutos a uma carga padrão de 75 e 100 W para mulheres e homens, respectivamente. Na primeira sessão de familiarização, o aquecimento era realizado por 5 minutos a 50 W devido à realização de esforço anterior (teste incremental). Após o aquecimento, mais uma calibração do equipamento era realizada com fim de ajustar as alterações de pressão de contato devido ao aumento da temperatura. Finalmente, o participante era submetido ao teste contrarrelógio de 4 km. Os dados de peso e altura do participante eram inseridos no programa RacerMateOne para ajuste da resistência do rolo, que eram calculadas pelo próprio *software*. Ao iniciar o teste, a relação da bicicleta utilizada deveria

estar na configuração de 3 para 1, ou o mais próximo disto possível, caso o participante tivesse trazido sua própria bicicleta. Antes do início de todos os testes, inclusive das sessões de familiarização, os participantes eram instruídos a completar o exercício no menor tempo possível e que se mantivessem sentados durante toda a duração do teste. Os participantes poderiam mudar de marcha livremente após o início do contrarrelógio. Nenhuma motivação ou informação como distância, tempo ou potência foi provida aos ciclistas exceto a distância cada 400 m, em um tom de voz neutro, até que o participante completasse os 4000 m. A potência e a velocidade médias e o tempo total do teste foram registrados como medidas fim. A cada 400 m os participantes reportaram a taxa de esforço percebido (PSE), pela escala de Borg de 6, sendo o esforço mínimo, a 20, o máximo (BORG, 1998). Nestes momentos, o pesquisador avaliador exibia uma tabela contendo os números em ordem crescente (anexo 1). Valores de relação Potência/PSE foram obtidos através da divisão simples entre a potência média da totalidade do teste pela PSE média obtida. A frequência cardíaca foi constantemente monitorada durante toda a duração dos testes principais com a utilização de um frequencímetro de cinta Garmin Hrm-Dual (Garmin, Estados Unidos da América). Ao fim do teste, mais uma vez o participante realizava um sprint de 5 segundos para obtenção de uma leitura dos valores de pressão entre o pneu e o equipamento.

4.3 Métodos comuns aos Estudos A e B

4.3.1 Questionário de Frequência Alimentar para alimentos fonte de cafeína

O questionário de frequência alimentar (apêndice 3) foi adaptado de um questionário previamente validado (BÜHLER; LACHENMEIER; SCHLEGEL, 2014) e foi aplicado sob a supervisão de um nutricionista qualificado. O questionário tem como fim avaliar a frequência de consumo de alimentos fonte de cafeína no último ano e, realizados os devidos cálculos, obter uma estimativa do consumo habitual de cafeína em mg/dia. O questionário contou com 7 categorias em sua versão: 1) produtos à base de café; 2) chás; 3) energéticos; 4) refrigerantes; 5) chocolates; 6) suplementos alimentares e 7) medicamentos adicionados de cafeína. As porções eram descritas em medidas caseiras e foram utilizadas para avaliar a quantidade de alimento consumido de acordo com a frequência consumida em número de vezes (0 a 10 vezes) por período (dia, semana, mês, ano). Para auxiliar na clareza e melhorar a precisão das estimativas, uma transparência era exibida aos participantes com imagens de utensílios comuns no território brasileiro em tamanho real (apêndice 11).

Quando possível, as marcas dos produtos consumidos eram identificadas e o conteúdo de cafeína destes produtos era posteriormente obtido. Quando não era possível obter as marcas dos produtos, os valores eram obtidos de artigos científicos ou tabelas de composição que tivessem avaliado a quantidade de cafeína nos produtos incluídos no questionário (apêndice 8). O valor final era calculado de acordo com a frequência de consumo relatada pelos participantes, sendo obtido através da multiplicação da frequência (1 a 10 vezes) pela quantidade obtida nas referências (em mg) e dividida pela periodicidade (dia: dividido por 1; semana: dividido por 7; mês: dividido por 30; ano: dividido por 365). Os valores obtidos em cada periodicidade eram então somados para a obtenção do valor total.

A confiabilidade deste questionário foi avaliada por meio de comparação em um modelo linear generalizado em distribuição gama. Como variável dependente foram inseridos os valores calculados pelo questionário e como variável explicativa os valores obtidos nos diários alimentares e recordatórios dos participantes do Estudo B. O tamanho amostral final foi de 83 participantes com 3 diários ou pelo menos 3 recordatórios de 24 horas. O modelo foi significativo, com valores de pseudo- R^2 (1 - *residual deviance/null deviance*) de 0,34 (i.e., 34% da variância foi explicada pelo modelo). Ademais, o coeficiente resultante, de 1,14 (95% CI: 0,58; 1,79), demonstra linearidade aproximada de 1 para 1 entre os dois métodos. Uma posterior análise de correlação de Spearman (dados não-normalmente distribuídos) resultou em um *rho* de 0,63 ($p < 0,0001$) entre o questionário e os diários e recordatórios, o que parece estar de acordo com o que é comumente encontrado na literatura. Deste modo, assume-se que o questionário tem boa correlação com os valores obtidos nos diários alimentares.

4.3.2 Questionário de sintomas habituais (Q-HAB)

O questionário de sintomas habituais ao consumo de cafeína (Q-HAB, apêndice 4) foi adaptado do que foi utilizado por James *et al.* (JAMES; CROSBIE; PAULL, 1987) e conta com 18 dos 24 sintomas do questionário original. Inicialmente o participante deveria indicar o tipo de fonte de cafeína que costuma consumir e a quantidade. Então, com base nos sintomas que geralmente apresenta ao consumir aquele alimento fonte, o participante deveria responder em uma escala Likert de 0 a 4, sendo 0 considerado “Nenhum” e 4 “Muito Alto” a intensidade dos seguintes sintomas: 1) ansiedade, 2) tensão, 3) tremores, 4) bem acordado, 5) não consigo dormir, 6) alerta, 7) agitação, 8) contrações musculares, 9) tremores musculares, 10) coração acelerado, 11) coração pulando batidas, 12) dor torácica, 13) queimação no peito, 14) estômago

irritado, 15) rosto corado, 16) ouvidos apitando, 17) dor de cabeça e 18) pensamento e fala acelerados. Além destes sintomas, o participante poderia preencher quaisquer outros sintomas que habitualmente experienciasse na sessão “Outros”.

4.3.3 Consumo alimentar pré-testes

O recordatório alimentar (apêndice 5) foi obtido dos participantes a cada visita principal, com fim de avaliar o consumo alimentar nas 24 horas que antecedem os testes. Ele foi preenchido tão detalhadamente quanto possível, registrando a refeição e o horário em que foi realizada, os alimentos incluídos com marca, quando possível, além do tamanho da porção em gramas ou medidas caseiras. Caso fossem utilizadas medidas caseiras, os participantes eram questionados sobre o tipo de utensílio, seu tamanho ou volume, e possíveis variações de quantidade (e.g., colher de servir pequena rasa, média ou cheia). Quando finalizado o preenchimento, o pesquisador responsável deveria conferir as informações obtidas com o participante a fim de corrigir possíveis desvios e obter mais precisão. A quantidade de calorias, macro e micronutrientes foi calculada por um pesquisador colaborador, nutricionista treinado, com uso do programa Dietbox (Dietbox, Brasil).

4.3.4 Questionário de sintomas agudos

Este questionário é uma segunda versão adaptada do questionário Q-HAB (sessão 4.3.2). Além da ausência da pergunta número 1, que se referia ao alimento ao qual o participante estava habituado, o sintoma “não consigo dormir” era substituído pelo sintoma “desidratação”, que foi considerado mais relevante agudamente. As versões utilizadas para os estudos A e B se encontram nos apêndices 6 e 9, respectivamente.

4.3.5 Processamento e análise das amostras biológicas

Todo sangue coletado em tubos durante os testes principais era armazenado em temperatura ambiente por até 2 horas por motivos logísticos e era, então, processado. O tempo de duas horas foi estabelecido através de recomendações do laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas do Estado de São Paulo. Os tubos contendo sangue que seria designado

para a extração de DNA eram congelados em um freezer a -20°C . Todo o restante, ou seja, aqueles que seriam utilizados para quantificação de cafeína e metabólitos, eram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4 graus celsius, a 3000 rpm durante 5 minutos. Dos tubos era extraído soro (tubo vermelho, seco) e plasma (EDTA e heparina), que eram imediatamente transferidos para microtubos de 1,5 ml em alíquotas de 0,750 ml cada e congelados a -20°C . Toda as amostras foram mantidas congeladas (-20°C) até as realizações das análise.

4.3.6 Isolamento de DNA e genotipagem

O processo de extração e isolamento de DNA se deu de sangue puro, através do método de *salting out*, assim como descrito por Artioli *et al.* (ARTIOLI, 2012). As amostras dos participantes de número 40, 44, 46, 48, 51, 52, 60, 71 e 88 foram perdidas em um erro no método de *salting out* e, deste modo, o DNA genômico foi extraído do soro com um kit de isolamento de DNA genômico com colunas de sílica (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. Invitrogen, Thermo Fisher, EUA). A genotipagem foi realizada utilizando o método de PCR em tempo real com sondas TaqMan® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América). Os equipamentos utilizados para a realização das análises de PCR foram o 7500 Fast (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) para as amostras extraídas de sangue puro e o StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) para as amostras de soro.

4.3.7 Quantificação de cafeína e seus metabólitos

As curvas de concentração de cafeína e seus metabólitos serão avaliadas por cromatografia líquida de alta precisão associada a um espectrômetro de massas. Os métodos dessas análises estão sendo padronizados em parceria com o laboratório do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Para a preparação da amostra, 100 μL de plasma serão transferidos para um tubo de polipropileno, seguidos por 10 μL de solução IS e 400 μL de metanol para precipitação de proteínas. O tubo será fechado, homogeneizado em vórtex por 30 segundos e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. A fase orgânica (150 μL) será transferida para frascos de LC, com 3 μL injetados no instrumento de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC–MS/MS).

As leituras serão realizadas em um sistema cromatográfico ACQUITY UPLC acoplado a um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo Xevo TQ-MS (Waters, MA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm; Waters, MA, EUA) mantida a 40°C. A fase móvel consistirá em (A) água ultra-pura contendo 5 mM de formiato de amônio e (B) metanol. A taxa de fluxo será de 0,3 mL/min, e a eluição em gradiente consistirá em uma mudança linear em %B: 10% por 0,5 min, mudando para 30% em 0,01 min, mantendo por 2,49 min e retornando a 10% em 0,01 min, totalizando um tempo de corrida de 4 minutos.

O espectrômetro de massas está equipado com uma fonte de ionização por electrospray, operando no modo positivo. As análises serão realizadas no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM), as transições selecionadas serão: 195,1>110 e 195,1>138 para cafeína, 204,1>116,1 e 204,1>144,2 para o IS, 181>124 para paraxantina, 181>108 e 181>138 para teobromina, e 181>69 e 181>96 para teofilina. Os parâmetros da fonte otimizados serão: voltagem do capilar de 2,5 kV, temperatura de dessolvatação de 500°C e fluxo de gás de 1000 L/h.

Os dados serão adquiridos e analisados com o software MassLynx (Waters, MA, EUA). O método está sendo validado de acordo com as diretrizes da Food and Drug Administration (FDA) para validação de métodos bioanalíticos.

4.4 Análises estatísticas

4.4.1 Estudo A

Todos os dados foram analisados utilizando o programa RStudio (RStudio 2023.06.2 Build 561, PBC, USA). As medidas de área abaixo da curva (AUC) de cafeína e seus metabólitos, assim como C_{max} e T_{max}, foram analisados através de um modelo linear generalizado (GLM) com genótipo CYP1A2 como variável explicativa (2 níveis, AA e AC/CC). Este procedimento foi adotado também para a AUC da soma dos sintomas físicos (tremores, contrações musculares, tremores musculares, coração acelerado, coração pulando batidas, dor torácica, queimação no peito, estômago irritado, rosto corado, ouvidos apitando, dor de cabeça e desidratação) e psicológicos (ansiedade, tensão, bem acordado, alerta, agitação, pensamento e fala acelerados) a cada ponto de tempo. Para os sintomas, como os valores de AUC advieram de um questionário com respostas de 0 a 10, a distribuição dos dados estava

distorcida para a esquerda (mais próximo de zero), seguindo então uma distribuição gama padrão. Já para os valores de sintomas psicológicos, apenas dois valores zero foram encontrados para AUC e, deste modo, uma constante (0,5) foi somada aos valores originais e um modelo linear generalizado gama foi utilizado. Os coeficientes foram então exponenciados para obter valores na mesma unidade de medida da escala original. Os cálculos de AUC de sintomas físicos resultaram em nove valores zero (37,5%) e, portanto, um modelo *two-step* foi calculado. Nestes modelos, uma regressão binomial é utilizada para verificar se a frequência de valores zero é diferente entre os genótipos, seguida por uma regressão gama para verificar a influência do genótipo para os valores não-zeros.

Modelos mistos de medidas repetidas foram utilizados para comparar os valores de pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca ao longo do tempo. Para este modelo, os valores médios de pressão arterial foram utilizados para ajuste do modelo como covariável. As variáveis explicativas fixas foram genótipo (2 níveis, AA e AC/CC) e tempo (6 níveis: 1, 3, 6, 8, 12 e 24 horas) e o fator randômico utilizado foi o número de identificação dos participantes (ID). Estes pontos no tempo foram utilizados devido à sua distância mínima de 2 horas de qualquer uma das refeições ($T_0 - 1h$, $+3h$, $+7h$ e $+12h$). Com intenção de verificar a influência do consumo habitual sobre as medidas de AUC de cafeína, metabólitos, sintomas e medidas cardiovasculares, os valores obtidos no questionário foram incluídos como variável explicativa (contínua) em interação com os genótipos nestes modelos. Para todos os testes, um valor de p (alfa) menor ou igual a 0,05 foi escolhido.

4.4.2 Estudo B

Os dados foram analisados utilizando o programa RStudio (RStudio 2023.06.2 Build 561, PBC, USA). As variáveis resposta tempo (até completar o contrarrelógio), potência média ($W_{méd}$), lactato (Lac), FC, PSE média e Potência/PSE (W/PSE) foram analisados através de modelo misto de medidas repetidas com as variáveis preditoras condição (3 níveis: cafeína 3mg/kg, cafeína 6 mg/kg e Placebo), genótipo CYP1A2 (3 níveis: AA, AC e CC) e com as variáveis randômicas indivíduo e sexo. Em razão da inclusão do fator genótipo, para o qual não houve randomização, os valores obtidos na condição controle foram utilizadas como covariável de correção para as variáveis Tempo, $W_{méd}$, PSE e FC. Devido à ausência da condição controle para alguns dos participantes que não completaram todas as visitas, uma média aritmética simples dos valores obtidos nas duas familiarizações foi utilizada em substituição. Este valor

pôde ser usado com segurança devido ao baixo coeficiente de variação (CV) encontrado entre estas três visitas (mediana: 2,72%, intervalo interquartil: 1,83 – 4,32%). Para a variável Lac, os valores de Lac pré-exercício (da própria condição) e os valores de Lac pós-exercício da condição controle foram utilizados como covariáveis. Devido à presença de uma sessão extra (placebo aberto) para os primeiros 64 participantes, uma análise de sensibilidade foi também realizada incluindo a ordem das sessões como covariável para verificar a existência de efeito de ordem. Nenhum efeito de ordem foi observado.

Para a análise dos valores de sintomas do consumo de cafeína, estes foram separados em psicológicos (ansiedade, tensão, bem acordado, alerta, agitação, pensamento e fala acelerados) ou físicos (tremores, contrações musculares, tremores musculares, coração acelerado, coração pulando batidas, dor torácica, queimação no peito, estômago irritado, rosto corado, ouvidos apitando, dor de cabeça e desidratação) e sua soma foi utilizada como variável resposta separadamente. Como variáveis preditoras foram incluídas as variáveis condição (3 níveis: CAF3, CAF6 e PLA) e genótipo (3 níveis: AA, AC e CC). Os fatores randômicos utilizados foram ID e sexo. Devido à distribuição com a presença de valores zero, uma constante de valor 1,0 foi somada aos valores obtidos e um modelo linear generalizado com distribuição gama foi utilizado para os sintomas psicológicos. Neste modelo, um teste qui-quadrado foi utilizado em substituição ao teste F para avaliação dos fatores individualmente. Para os sintomas físicos, a alta frequência de valores zero exigiu a utilização de um modelo *two-step* (BELOTTI; DEB; MANNING; NORTON, 2015). Sendo assim, uma regressão binomial é utilizada para verificar se a frequência de valores zero é diferente entre os genótipos, seguida por uma regressão gama para verificar a influência do genótipo para os valores não-zeros.

Para avaliação da variação das dietas, a soma dos valores de calorias (kcal), proteínas (g), carboidratos (g) e gorduras (g) totais ingeridos, divididos pela massa corpórea de cada participante ($\text{kcal ou g} \cdot \text{kg MC}^{-1}$), foram comparados entre as condições e os genótipos em um modelo misto (condição * genótipo + ID). Também, o CV de cada um destes itens foi calculado separadamente para participantes do sexo feminino e masculino. Para isto, o desvio padrão dos valores obtidos para cada medida, separados por indivíduo, foram divididos por sua média correspondente. Os valores demonstrados (tabela 7) são a média com mínimo e o máximo CV por sexo.

Para avaliar o cegamento, um teste qui-quadrado em uma tabela de contingência 3x3 (condição [3 níveis] vs. “o que você acha que tomou?” [3 níveis com a fusão de ambas as

respostas que se referiam à cafeína: “não sei”, “cafeína”, “placebo”]) foi realizado. Os resíduos padronizados foram calculados para apontar valores influentes sobre o teste, com valores $\geq 2,0$ tendo impacto importante sobre a estatística qui-quadrado. Adicionalmente, o *Blinding Index* de JAMES; BLOCH; LEE; KRAEMER *et al.* (1996) foi calculado. Para isto, uma matriz foi criada com as frequências das respostas possíveis (linhas: placebo, cafeína 3 mg/kg, cafeína 6 mg/kg ou não sei) e condições (colunas). Os pesos atribuídos foram de 0 (zero) para respostas corretas; 0,25 para respostas corretas para tratamento, mas incorretas para dose; 0,5 para respostas incorretas e 1 para respostas “não sei”. Um cálculo alternativo também foi calculado englobando as respostas de cafeína em apenas uma (“cafeína”). Para este, os pesos foram de 0 para respostas corretas, 0,5 para respostas incorretas e 1 para respostas “não sei”.

Assumindo efeito similar da cafeína entre os genótipos e condições (resultados obtidos nas análises principais descritas anteriormente), a influência de fatores secundários foi observada sobre o delta tempo em modelos mistos. Para o cálculo do delta tempo foi realizada a diferença simples (delta) entre os valores de tempo das condições placebo, CAF3 e CAF6 e os valores de *baseline* (média dos valores das familiarizações 1 e 2, e da condição controle). Como fatores fixos foram utilizados genótipo (AA vs. AC/CC - agrupados devido ao baixo número de CCs) em interação com condição (3 níveis) e com um dos fatores secundários por vez. Os fatores randômicos utilizados foram ID do indivíduo e sexo. Os fatores secundários investigados foram a soma de sintomas psicológicos, o consumo habitual de cafeína (em mg/kg de peso), o horário do dia em que os testes foram realizados, a resposta ao questionário pós-exercício (avaliação do cegamento) e os valores obtidos nos cálculos da dieta de 24 horas (i.e., calorias, proteínas, carboidratos e gorduras por kg MC).

Uma última análise foi realizada consistindo em 5.000 reamostragens *bootstrapping* não-paramétrico. Cada uma das 5.000 iterações contou com amostragem com reposição de 45, 45 e 10 participantes de genótipo AA, AC e CC, seguindo a distribuição mais próxima da encontrada na população. Para lidar com os valores faltantes, imputações múltiplas foram realizadas cinco vezes para cada reamostragem com a função ‘mice’ do pacote de mesmo nome [técnica Boot MI (SCHOMAKER; HEUMANN, 2018)]. A configuração utilizada foi a ‘norm.predict’, que gera valores através de regressões lineares múltiplas utilizando os valores obtidos e não faltantes para prever os valores faltantes. Um modelo de regressão linear *stepwise backward* foi realizado para cada uma das 5 amostras imputadas e os coeficientes destas amostras foram combinados através da função ‘pool’ do pacote ‘mice’. Nestes modelos, foi incluída a variável dependente tempo e os fatores fixos genótipo e condição em interação. As

covariáveis testadas foram 1) valores *baseline*; 2) respostas ao questionário pós-exercício (cegamento); 3) o horário do dia; 4) o consumo habitual de cafeína (mg/kg MC), 5) o consumo de CHO nas 24 horas que antecederam os testes (g/kg MC) e 6) sexo. O percentual de valores de p significantes obtidos para cada covariável foram calculados e foram mantidos no modelo apenas as covariáveis que obtivessem pelo menos 50% dos valores abaixo do limite determinado (ROYSTON; SAUERBREI, 2009). Para as covariáveis incluídas no modelo final foram calculados o *estimate* (média dos coeficientes obtidos nos 5000 modelos) e os intervalos de credibilidade. Estes foram obtidos pela ordenação dos coeficientes de cada um dos 5000 modelos, selecionando os quantis 0,025 e 0,975 (ICr 95%) (PUTH; NEUHAUSER; RUXTON, 2015).

Para todas as análises foi definido o valor de p significativo $\leq 0,05$. As análises post-hoc, assim como a extração das médias estimadas (*estimates*) dos modelos, foram realizadas com a função *emmeans* do pacote *emmeans*, quando necessário. O método de Bonferroni foi utilizado para correção dos valores de p de comparações múltiplas, multiplicando-os pelo número de interações de interesse (m), enquanto os intervalos de confiança eram calculados com base na multiplicação do erro padrão (SE) pelo valor da distribuição-t obtido com o alfa ajustado $(1 - (1 - \alpha)^{1/m})$ e os graus de liberdade (df) fornecidos pelo modelo. O tamanho de efeito utilizado foi uma adaptação da transformação dos valores de t obtidos nas comparações do modelo misto em D de Cohen (FRIEDMAN, 1982) e foi classificado como muito pequeno ($\geq 0,01$ e $< 0,2$), pequeno ($\geq 0,2$ e $< 0,5$), médio ($\geq 0,5$ e $< 0,8$) e grande ($\geq 0,8$) (SAWILOWSKY, 2009). A função utilizada para o cálculo foi a “t_to_d”, do pacote “effectsize” e seu cálculo é realizado da seguinte maneira, considerando o t-valor obtido nas comparações par a par e o valor de graus de liberdade do erro padrão (df_{erro}), também obtido da mesma forma:

$$D \text{ de Cohen} = 2 \times t / \sqrt{df_{erro}}$$

5. RESULTADOS

5.1. Estudo A

5.1.1 Caracterização

Vinte e quatro (24) participantes foram incluídos na amostra, todos do sexo masculino, sendo 13 indivíduos de genótipo AA, 9 AC e 2 CC para CYP1A2. Devido ao baixo número de indivíduos de genótipo CC, estes foram agregados aos AC, formando o grupo ACCC. As informações de caracterização dos participantes separadas por genótipo se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Características dos 24 participantes do Estudo A separados por genótipo.

	Genótipos		Valor de p (teste-t AA vs. AC/CC)
	AA	ACCC	
Número de indivíduos, n	13	11	-
Altura (m), média (DP)	1,76 (0,03)	1,77 (0,06)	0,61
Peso (kg), média (DP)	78,1 (7,6)	76,4 (7,8)	0,59
IMC (kg/m²), média (DP)	25,2 (2,5)	24,4 (2,1)	0,38
Consumo habitual de cafeína (mg), média estimada (SE)	237 (47,8)	309 (67,7)	0,40
Score de efeitos físicos habituais, mediana (mín-máx)	3 (0 - 11)	3 (0 - 14)	0,80
Score de efeitos psicológicos habituais, mediana (mín-máx)	7 (0 - 18)	9 (0 - 16)	0,52

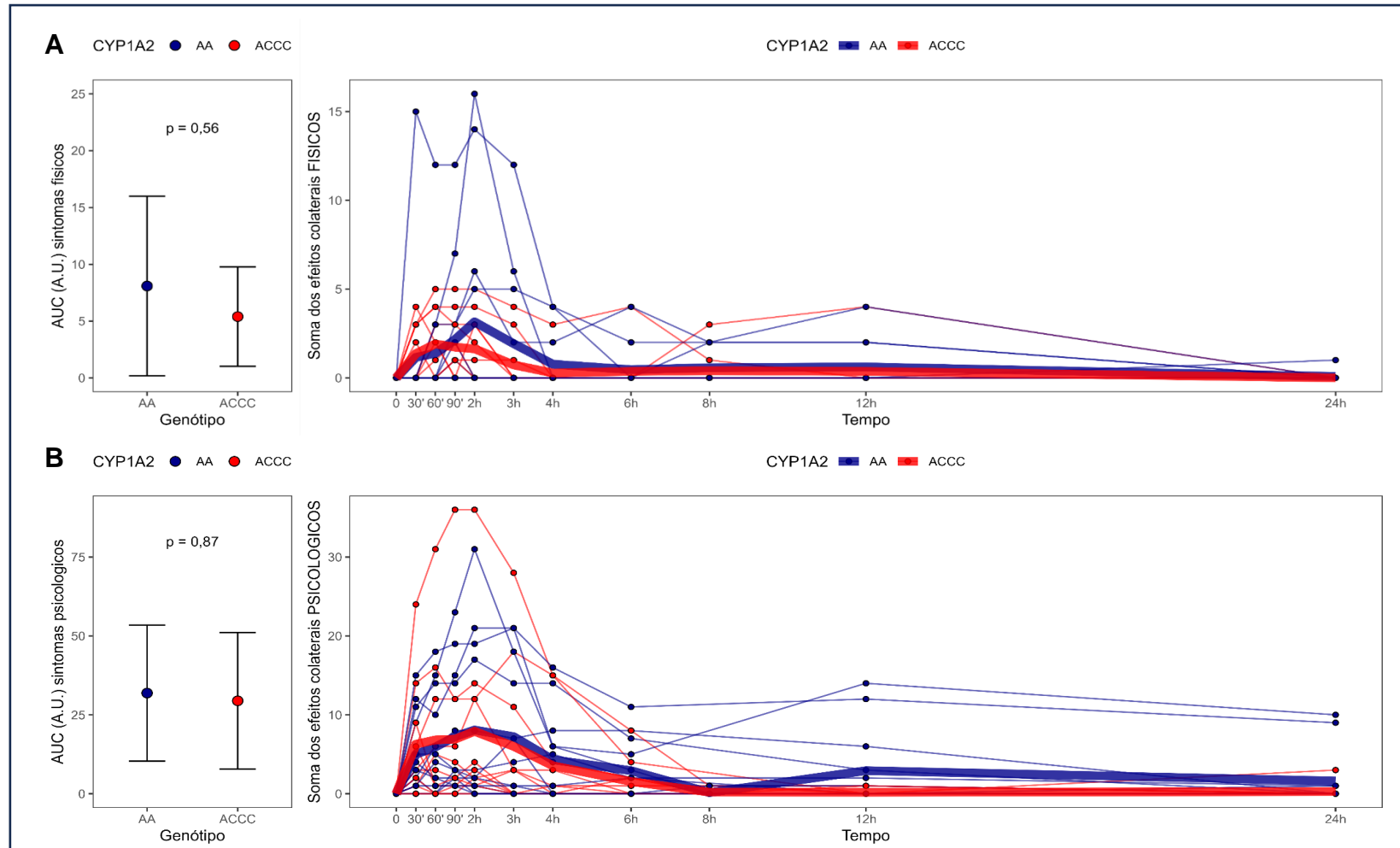
Legenda: DP, desvio padrão; SE, erro padrão.

Fonte: Elaborada pelo autor com base nos dados obtidos neste trabalho.

5.1.2 Sintomas

Não foi encontrada diferença entre os genótipos CYP1A2 nos valores transformados de área abaixo da curva para sintomas psicológicos ($t = -0,81$; $p = 0,42$), na frequência de zeros para sintomas físicos ($t = 0,96$, $p = 0,08$) e na AUC para valores não-zeros ($t = 0,76$, $p = 0,10$). Os valores médios estimados de área abaixo da curva e seus intervalos de confiança de 95%, além de valores individuais de sintomas psicológicos e físicos obtidos a cada ponto no tempo entre os genótipos CYP1A2 estão descritos na Figura 8, painéis A e B, respectivamente.

Figura 8. Valores de média estimada de área abaixo da curva e seus intervalos de confiança de 95%, valores de p da comparação, além de valores individuais de sintomas psicológicos (painel A) e físicos (painel B) entre os genótipos CYP1A2. À direita, as linhas grossas azuis e vermelhas representam a média dos valores de sintomas ao longo do tempo para os genótipos AA e ACCC, respectivamente. As linhas finas e pontos representam os valores individuais dos participantes a cada ponto no tempo separados entre os genótipos AA (azuis) e ACCC (vermelhos).



Fonte: Imagem do autor criada com base nos dados obtidos neste trabalho.

5.1.3 Pressão arterial (sistólica e diastólica) e frequência cardíaca

O efeito dos valores médios de pressão arterial sistólica como covariável foi significativo ($F(1; 118) = 254,2; p = < 0,0001$), demonstrando impacto dos valores individuais sobre o modelo. Entretanto, não foi encontrado efeito simples de genótipo ($F(1; 118) = 0,1; p = 0,79$), mas sim um efeito de tempo ($F(5; 118) = 10,7; p < 0,0001$). Não foi observado efeito de interação entre genótipo e tempo ($F(5; 118) = 2,3; p = 0,052$; Tabela 3). Os valores de pressão arterial diastólica foram afetados significativamente por seus valores médios ($F(1; 118) = 198,0; p = < 0,0001$). Entretanto, não foi encontrado efeito simples de genótipo ($F(1; 118) = 1,1; p = 0,30$), mas sim um efeito de tempo ($F(5; 118) = 4,8; p = 0,0005$). Não foi observado efeito de interação entre genótipo e tempo ($F(5; 118) = 1,9; p = 0,11$; Tabela 3). Os valores médios afetaram significativamente os valores de frequência cardíaca ($F(1; 119) = 374,9; p = < 0,0001$). Não foi encontrado efeito simples de genótipo ($F(1; 119) = 0,11; p = 0,74$), tempo ($F(5; 119) = 2,00; p = 0,08$), ou de interação entre genótipo e tempo ($F(5; 119) = 0,70; p = 0,63$; Tabela 3).

5.1.4 Influência do consumo habitual sobre os sintomas e medidas cardiovasculares

O consumo habitual não afetou a AUC de sintomas psicológicos para o genótipo AA ($t = 0,3; p = 0,73$) e esta resposta não foi diferente para os indivíduos ACCC ($t = 0,7; p = 0,51$). Para sintomas físicos, o consumo habitual não afetou a frequência de valores zero para indivíduos AA ($z = 0,9; p = 0,38$) e não foi diferente para indivíduos ACCC ($z = -0,6; p = 0,56$). Ademais, não houve influência do consumo habitual sobre os valores não-zero para AAs ($t = 0,3; p = 0,74$) e não foi diferente para ACCCs ($t = 0,2; p = 0,81$). Não houve interação entre consumo habitual, tempo e genótipo para pressão arterial sistólica ($F(5; 106) = 0,72; p = 0,61$), diastólica ($F(5; 106) = 0,42; p = 0,83$) ou frequência cardíaca ($F(5; 107) = 1,00; p = 0,42$).

Tabela 3. Valores de pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca estimados pelo modelo linear misto e seus valores de Intervalo de Confiança de 95% (95% CI) separados por genótipo.

	Tempo (h)	Genótipos		
		Total	AA	ACCC
		Média estimada (95% CI)	Média estimada (95% CI)	Média estimada (95% CI)
Pressão arterial sistólica, mmHg	1	124 (121; 126)*	123 (119; 126)	126 (122; 129)
	3	121 (118; 124)*	123 (119; 126)	120 (116; 124)
	6	121 (119; 124)*	120 (117; 124)	123 (119; 127)
	8	118 (115; 121)*	120 (115; 125)	117 (113; 121)
	12	121 (119; 124)*	119 (116; 123)	124 (120; 127)
	24	111 (108; 114)	114 (111; 118)	108 (103; 112)
Pressão arterial diastólica, mmHg	1	75 (73; 77)*	74 (71; 77)	76 (73; 80)
	3	75 (72; 77) *	75 (72; 78)	74 (71; 77)
	6	71 (69; 73)	71 (68; 75)	71 (67; 74)
	8	71 (68; 74)	72 (67; 77)	71 (67; 74)
	12	75 (73; 77) *	74 (71; 77)	76 (73; 80)
	24	69 (66; 71)	72 (69; 75)	65 (61; 69)
Frequência cardíaca, batimentos por minuto	1	64 (62; 66)	64 (60; 68)	64 (60; 69)
	3	62 (59; 64)	62 (58; 67)	61 (56; 66)
	6	63 (61; 66)	64 (60; 68)	63 (58; 68)
	8	64 (61; 66)	63 (57; 69)	65 (60; 70)
	12	62 (59; 64)	62 (58; 66)	61 (56; 66)
	24	66 (63; 68)	64 (60; 68)	67 (62; 73)

Legendas: *, valor significativamente diferente do obtido no tempo de 24 horas (efeito simples de tempo).

Fonte: tabela criada pelo autor com os dados obtidos neste trabalho.

5.2. Estudo B

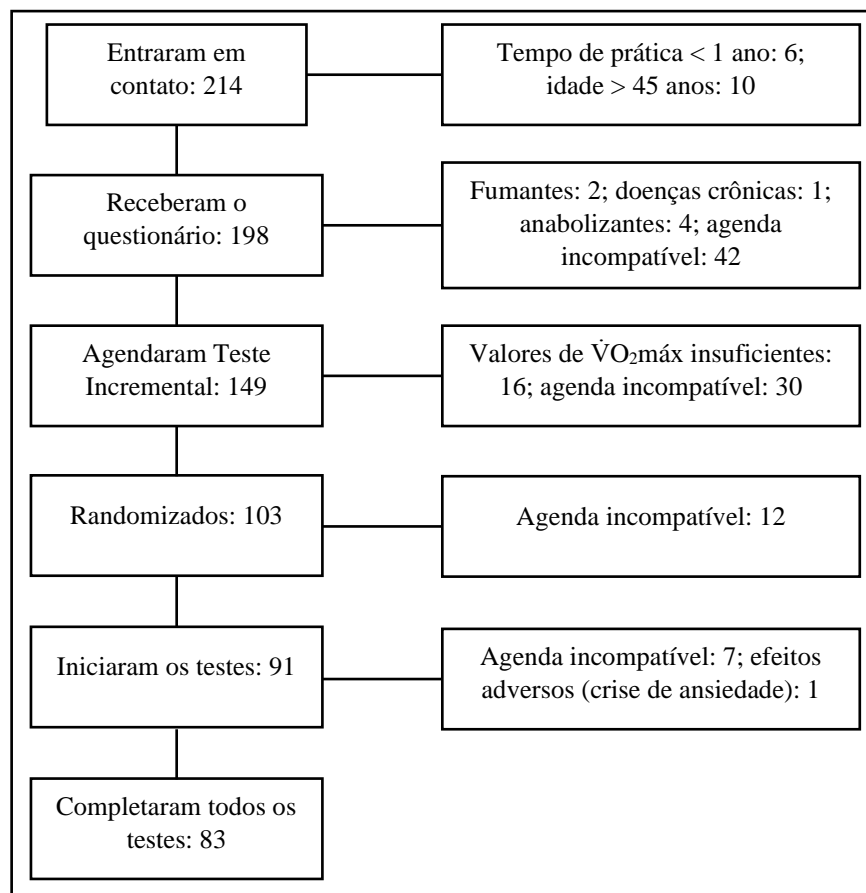
5.2.1 Caracterização

Um total de 103 participantes foram testados e incluídos na amostra. Destes, 91 (63 do sexo masculino e 28 do sexo feminino) realizaram ao menos uma visita principal e foram incluídos nas análises. Oitenta e três (83) participantes completaram todas as visitas. O sumário

do fluxo de participantes se encontra na Figura 9. Apenas uma participante (número 24, sexo feminino) foi excluído das análises devido a ter se recusado a realizar o máximo do seu esforço por (S.I.C.) ‘não ser competitivo’. Seus dados foram mantidos no restante das análises (sangue e sintomas).

Dos participantes que realizaram ao menos uma visita principal, 63 eram do sexo masculino e 28 do sexo feminino. As informações de caracterização dos participantes separadas por sexo e genótipo se encontra na Tabela 4.

Figura 9. Fluxo de participantes do estudo B.



Fonte: Imagem do autor criada com base nos dados obtidos neste trabalho.

Tabela 4. Caracterização dos participantes separados por sexo e genótipo. Com exceção do consumo habitual de cafeína, os valores estão representados em médias e desvios padrão.

Genótipo [n]	Feminino			
	Total [28]	AA [10]	AC [16]	CC [2]
Idade (anos)	36 (7)	32 (4)	36 (7)	41 (3)
Peso (kg)	64,0 (7,7) *	63,6 (6,1)	63,2 (9,0)	66,6 (6,9)
Altura (m)	1,63 (0,06) *	1,62 (0,07) \$	1,63 (0,05) \$	1,71 (0,16)
IMC (kg/m ²)	23,1 (5,0)	22,0 (8,1)	23,8 (2,4)	22,8 (1,8)
% gordura corporal	25,0 (4,7) *	26,2 (5,4)	23,2 (3,7)	30,2 (1,2)
Anos de prática (anos)	2,8 (2,7)	2,2 (1,1)	2,2 (1,6)	2,5 (0,7)
Volume/semana (km)	147 (88) *	179 (134)	127 (53)	175 (35)
Horas de treino/semana	7,6 (3,5)	8,4 (3,9)	7,3 (3,7)	9,0 (1,4)
ṠO ₂ pico (mL/kg/min)	42,5 (5,3) *	45,2 (4,6)	41,5 (5,7)	38,1 (1,5)
Cafeína diária (mg); <i>estimate</i> (erro padrão)	285 (74)	244 (69)	399 (90)	212 (190)
Genótipo [n]	Masculino			
	Total [63]	AA [27]	AC [31]	CC [5]
Idade (anos)	35 (8)	35 (8)	36 (7)	41 (5)
Peso (kg)	77,3 (9,4) *	78,6 (9,6)	76,8 (9,3)	77,0 (6,4)
Altura (m)	1,77 (0,07) *	1,79 (0,07) \$	1,76 (0,06) \$	1,74 (0,05)
IMC (kg/m ²)	24,7 (2,7)	24,5 (2,6)	24,9 (3,0)	25,3 (2,1)
% gordura corporal	14,8 (6,2) *	14,9 (6,5)	14,7 (6,4)	14,9 (3,5)
Anos de prática (anos)	5,1 (5,3)	4,9 (5,3)	6,1 (6,0)	3,7 (1,7)
Volume/semana (km)	224 (109) *	209 (110)	205 (100)	265 (139)
Horas de treino/semana	10,2 (9,4)	11,4 (14,4)	8,9 (4,1)	9,4 (4,6)
ṠO ₂ pico (mL/kg/min)	54,1 (7,5) *	53,0 (8,4)	54,5 (5,6)	51,4 (5,9)
Cafeína diária (mg); <i>estimate</i> (erro padrão)	266 (45)	216 (40)	284 (47)	299 (120)

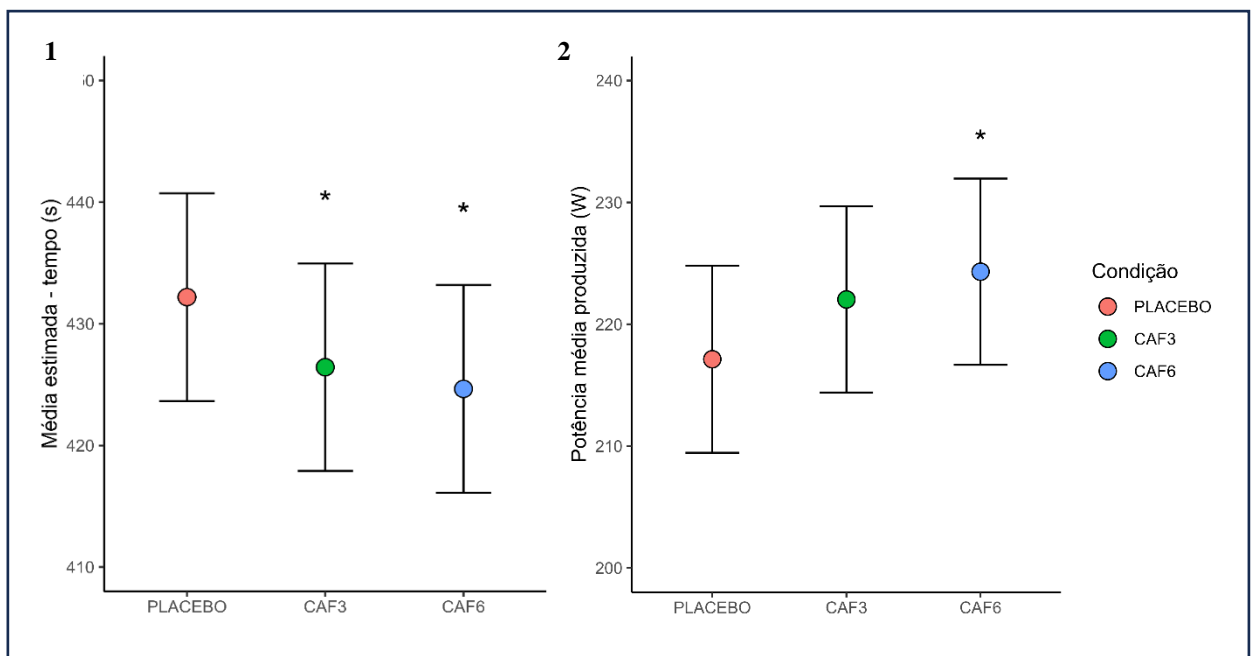
Legenda: DP, desvio padrão; IMC, índice de massa corpórea; MC, massa corpórea; *, significantemente diferente de participantes do sexo oposto no geral no teste pós-hoc; \$, significantemente diferente de participantes do sexo oposto com o mesmo genótipo no teste pós-hoc; *estimate*, média marginal estimada pelo modelo. **Fonte:** tabela criada pelo autor com os dados obtidos no trabalho.

5.2.2 Cafeína x genótipos no desempenho

5.2.2.1 Tempo

Os valores de tempo foram afetados pelos valores de *baseline* ($F(1; 65,9) = 163,37; p < 0,0001$), demonstrando um impacto das diferenças em *baseline* sobre os resultados. Um efeito simples de condição foi observado ($F(2; 160,0) = 5,49; p = 0,01$; Figura 10, painel 1), mas nenhum efeito simples de genótipo ($F(2; 80,3) = 1,55; p = 0,22$) ou interação entre condição e genótipo ($F(4; 159,8) = 0,47; p = 0,76$) foram encontrados. Os testes post-hoc demonstraram um maior desempenho na condição CAF6 comparada a PLA (*estimate*: 6,64 s; IC 95%: 2,56; 10,72; $t = 3,21$; $d = 0,41$; IC 95%: 0,10; 0,72; $p = 0,005$), e na condição CAF3 comparada à PLA (*estimate*: 5,23 s; IC 95%: 1,15; 9,32; $t = 2,53$; $d = 0,33$; IC 95%: 0,02; 0,63, $p = 0,04$), sem diferenças entre CAF3 e CAF6 (*estimate*: 1,40 s; IC 95%: -2,47; 5,28; $t = 0,72$; $d = 0,09$; IC 95%: -0,21; 0,40; $p = 1,0$).

Figura 10. Valores de média e erro padrão (SE) estimados de: painel 1) tempo até completar o contrarrelógio de 4 km e painel 2) potência média produzida (W) separados por condição. *, diferença da condição placebo significante detectada pelo post-hoc com ajuste de Bonferroni.



Fonte: Figura criada pelo autor com os dados obtidos no presente trabalho.

5.2.2.2 Potência Média

Para a Potência Média, houve influência dos valores de *baseline* ($F(1; 45,0) = 309,74$; $p < 0,0001$), além de um efeito simples de condição ($F(2; 159,6) = 4,67$; $p = 0,01$ Figura 10, painel 2), demonstrando um impacto dos valores individuais sobre os resultados. Nenhum efeito simples de genótipo ou interação entre condição e genótipo foi observado (todos $p \geq 0,20$). Os testes post-hoc demonstraram maiores valores de Potência Média na condição CAF6 comparada a PLA (*estimate*: 7,18 W; IC 95%: 2,48; 11,89; $t = 3,02$; $d = 0,39$; IC 95%: 0,08; 0,70; $p = 0,009$), enquanto a diferença encontrada entre PLA e CAF3 não foi significativa (*estimate*: 4,91 W; IC 95%: -0,85; 10,66; $t = 2,06$; $d = 0,27$; IC 95%: -0,04; 0,57; $p = 0,12$) ou CAF3 e CAF6 (*estimate*: 2,28 W; IC 95%: -2,19; 6,74; $t = 1,01$; $d = 0,13$; IC 95%: -0,18; 0,44; $p = 0,95$).

5.2.2.3 Lactato

Para o Lactato, ambos os valores pré-exercício (Lacpre; $F(1;201,5) = 10,25$; $p = 0,002$) e *baseline* (Lacbase; $F(1;73,3) = 59,5$; $p < 0,0001$) foram significativos para o modelo, demonstrando um impacto dos valores individuais sobre o modelo. Ademais, não foram encontrados efeitos simples de condição, genótipo ou de interação entre condição e genótipo (todos $p \geq 0,051$). Apesar dos resultados não significantes para lactato no pós-exercício, pequenos tamanhos de efeito foram observados condição CAF6 em comparação com PLA (*estimate*: 1,3 mmol/mL; IC 95% -0,05; 2,58; $d = 0,33$; IC 95% -0,01; 0,67), CAF3 em comparação com PLA (*estimate*: 1,12 mmol/mL; IC 95% -0,18; 2,24; $d = 0,29$; IC 95% -0,05; 0,63), com um efeito muito pequeno (ou negligível) entre CAF3 e CAF6 (*estimate*: 0,14 mmol/mL; IC 95% -1,01; 1,30; $d = 0,04$; IC 95% -0,30; 0,38).

5.2.2.4 Frequência cardíaca

O efeito dos valores de *baseline* foi significativo para FC média ($F(1, 76,3) = 38,7$, $p < 0,0001$). Um efeito simples de condição foi detectado pelo modelo ($F(2;137,3) = 3,78$; $p = 0,03$), com valores maiores de FC em comparação ao PLA na condição CAF6 (*estimate*: 5 bpm; IC 95%: 0; 9; $t = 2,58$; $d = 0,36$; IC 95%: 0,02; 0,70, $p = 0,03$), mas não na condição CAF3 (*estimate*: 4 bpm; IC 95%: -0; 9; $t = 2,21$; $d = 0,31$; IC 95%: -0,03; 0,64; $p = 0,09$). Não houve

diferença entre CAF3 e CAF6 (*estimate*: 1 bpm; IC 95%: -4; 5; $t = 0,39$; $d = 0,05$; IC 95%: -0,28; 0,39, $p = 1,0$). Nenhum efeito de genótipo ou interação entre condição e genótipo foi identificado (ambos $p \geq 0,71$, Tabela 5).

5.2.2.5 Percepção subjetiva de esforço

Para percepção subjetiva de esforço (PSE), apesar da influência dos valores de *baseline* ($F(1;80,9) = 438,9$; $p < 0,0001$), nenhum efeito simples de condição ou genótipo, ou de interação entre condição e genótipo foi observado (todos $p \geq 0,30$, Tabela 5).

5.2.2.6 Relação potência/PSE (W/PSE)

Os valores de W/PSE foram também afetados pelas diferenças em *baseline* ($F(1; 79,1) = 525,36$; $p < 0,0001$). A relação W/PSE foi diferente entre as condições ($F(2; 160,2) = 4,07$; $p = 0,02$), mas nenhum efeito simples de genótipo, ou interação entre condição e genótipo foi observado (todos $p \geq 0,08$). A W/PSE foi maior na condição CAF6 comparada com PLA (*estimate*: 0,75 W/+1 PSE; IC 95%: 0,23; 1,27; $t = 2,85$; $d = 0,37$; IC 95%: 0,06; 0,68; $p = 0,01$), mas não foi diferente entre CAF3 e PLA (*estimate*: 0,43 W/+1 PSE; IC 95%: -0,09; 0,95; $t = 1,64$; $d = 0,21$; IC 95%: -0,10; 0,52; $p = 0,31$) ou CAF3 e CAF6 (*estimate*: 0,32 W/+1 PSE; IC 95%: -0,17; 0,81; $t = 1,27$; $d = 0,17$; IC 95%: -0,15; 0,48; $p = 0,61$).

Tabela 5. Valores de média estimada e erro padrão (SE), diferença estimada pelo modelo linear misto e seus intervalos de confiança de 95%, além de valores de tamanho de efeito (D de Cohen) e seus intervalos de confiança de 95% para frequência cardíaca, lactato pós-exercício, potência média e PSE média (percepção subjetiva de esforço) separados por genótipo CYP1A2. As comparações demonstradas são entre a condição (coluna condição) e a condição placebo.

Desfecho	Genótipo	Média estimada PLA (SE)	Condição	Média estimada Condição (SE)	Diferença estimada Condição - PLA (IC 95%)	D de Cohen (IC 95%)
Tempo (s)	AA	433,6 (8,9)	CAF3	426,4 (8,9)	7,1 (1,2; 13,0)	0,43 (0,08; 0,80)
			CAF6	425,4 (8,9)	8,1 (2,3; 14,0)	0,50 (0,14; 0,86)
	AC	429,4 (8,9)	CAF3	425,7 (8,9)	3,6 (-2,0; 9,1)	0,23 (-0,2; 0,59)
			CAF6	422,4 (8,9)	6,9 (1,4; 12,5)	0,45 (0,09; 0,81)
	CC	438,4 (10,8)	CAF3	434,6 (10,7)	4,8 (-10,6; 20,2)	0,11 (-0,24; 0,47)
			CAF6	433,7 (10,7)	4,7 (-10,7; 20,2)	0,11 (-0,25; 0,47)
Potência média (W)	AA	216,6 (7,6)	CAF3	223,3 (7,6)	6,7 (-0,8; 13,5)	0,36 (-0,00; 0,71)
			CAF6	224,9 (7,6)	8,3 (1,6; 15,1)	0,45 (0,08; 0,81)
	AC	222,4 (7,6)	CAF3	225,8 (7,6)	3,3 (-3,0; 9,7)	0,19 (-0,17; 0,55)
			CAF6	229,7 (7,6)	7,3 (0,9; 13,6)	0,41 (0,05; 0,77)
	CC	212,3 (10,4)	CAF3	216,9 (10,2)	4,7 (-13,1; 22,4)	0,09 (-0,26; 0,45)
			CAF6	218,2 (10,2)	6,0 (-11,8; 23,7)	0,12 (-0,23; 0,48)
Frequência cardíaca (bpm)	AA	154 (3)	CAF3	159 (3)	6 (0; 11)	0,42 (0,03; 0,80)
			CAF6	158 (3)	4 (-1; 9)	0,32 (-0,07; 0,70)
	AC	155 (3)	CAF3	158 (3)	3 (-2; 8)	0,26 (-0,12; 0,65)
			CAF6	160 (3)	5 (0; 9)	0,39 (0,00; 0,78)
	CC	151 (6)	CAF3	155 (5)	3 (-10; 17)	0,10 (-0,29; 0,48)
			CAF6	157 (5)	5 (-9; 19)	0,15 (-0,23; 0,53)

Lactato (mmol/mL)	AA	9,1 (0,5)	CAF3	10,1 (0,5)	1,0 (-0,6; 2,6)	0,25 (-0,14; 0,65)
			CAF6	11,2 (0,5)	2,1 (0,4; 3,7)	0,50 (0,11; 0,90)
	AC	10,1 (0,4)	CAF3	11,1 (0,4)	1,0 (-0,5; 2,4)	0,27 (-0,12; 0,66)
			CAF6	11,0 (0,4)	0,9 (-0,6; 2,3)	0,23 (-0,16; 0,62)
	CC	8,5 (1,3)	CAF3	9,8 (1,1)	1,4 (-2,6; 5,3)	0,14 (-0,26; 0,53)
			CAF6	9,3 (1,1)	0,9 (-3,1; 4,8)	0,09 (-0,31; 0,48)
PSE média (U.A.)	AA	14 (0)	CAF3	14 (0)	0 (-1; 0)	-0,08 (-0,44; 0,28)
			CAF6	14 (0)	0 (-0; 0)	-0,03 (-0,39; 0,33)
	AC	14 (0)	CAF3	14 (0)	0 (-0; 0)	-0,05 (-0,41; 0,30)
			CAF6	14 (0)	0 (-0; 0)	-0,06 (-0,42; 0,30)
	CC	15 (0)	CAF3	14 (0)	1 (-0; 2)	0,22 (-0,14; 0,58)
			CAF6	14 (0)	1 (-0; 2)	0,25 (-0,11; 0,61)
W/PSE (W/U.A.)	AA	16,0 (0,3)	CAF3	16,2 (0,3)	0,2 (-0,5; 1,0)	0,09 (-0,26; 0,46)
			CAF6	16,6 (0,3)	0,6 (-0,2; 1,3)	0,29 (-0,08; 0,65)
	AC	16,8 (0,3)	CAF3	17,0 (0,3)	0,2 (-0,5; 0,9)	0,09 (-0,27; 0,45)
			CAF6	17,3 (0,3)	0,5 (-0,2; 1,2)	0,26 (-0,10; 0,62)
	CC	15,2 (0,8)	CAF3	16,1 (0,8)	0,9 (-1,0; 2,9)	0,17 (-0,19; 0,53)
			CAF6	16,4 (0,8)	1,1 (-0,8; 3,1)	0,21 (-0,15; 0,57)

Legenda: PLA, condição placebo; SE, erro padrão; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; CAF3, condição cafeína 3 mg/kg de massa corpórea; CAF6, condição cafeína 6 mg/kg de massa corpórea.

Fonte: Figura criada pelo autor com os dados obtidos no presente trabalho.

5.2.3 Intensidade dos sintomas

Para efeitos psicológicos, os testes estatísticos não encontraram efeito de genótipo, condição ou interação (todos $p \geq 0,63$).

Os testes F realizados no modelo *two-step* para sintomas físicos não encontraram diferenças na frequência de valores zero entre os genótipos, condições ou interação (todos $p \geq 0,42$), ou diferenças nos valores estimados (todos $p \geq 0,18$).

5.2.4 Cegamento

Foi encontrado um valor de qui-quadrado significativo ($\chi^2 = 13,6$, $df = 4$, $p = 0,009$) ao avaliar a frequência das respostas do questionário pós-exercício entre as condições. Os resíduos padronizados apontam para uma frequência maior de respostas “cafeína” na condição CAF6 (resíduo padronizado = 2,69), também maior de respostas “placebo” na condição PLA (resíduo padronizado = 2,37) e menor de respostas “cafeína” na condição PLA (resíduo padronizado = -3,48). Um sumário das frequências das respostas entre as condições está representado na Tabela 6. Para o *blinding index* de James, um valor de 0,571 (IC 95%: 0,521; 0,621) foi encontrado, significando que os participantes não detectaram a condição a que foram submetidos mais do que se tivessem escolhido aleatoriamente.

Tabela 6. Tabela de contingência demonstrando a contagem de respostas "Não sei", "Placebo" e "Cafeína" para o questionário pós-exercício entre as condições PLACEBO, CAF3 e CAF6, além dos valores de resíduos padronizados para cada combinação (entre parêntesis). Valores próximos a ou mais extremos que 2 (ou -2) são considerados de alto impacto sobre o teste qui-quadrado.

	‘Não sei’	‘Placebo’	‘Cafeína’
PLACEBO	25 (1,87)	30 (2,15)	29 (-3,48)
CAF3	19 (-0,04)	20 (-0,86)	45 (0,80)
CAF6	13 (-1,83)	18 (-1,30)	51 (2,69)

Legenda: CAF3, condição cafeína 3 mg/kg de massa corpórea; CAF6, condição cafeína 6 mg/kg de massa corpórea. **Fonte:** Tabela criada pelo autor com os dados obtidos no presente trabalho.

5.2.5 Dieta

Os valores medianos de coeficiente de variação e seus máximos e mínimos estão na Tabela 7. Os modelos não detectaram diferenças significantes nos valores de Energia (kcal), carboidratos, proteínas ou lipídios (em gramas dividido pela massa corpórea) entre as condições e genótipos (todos $p \geq 0,11$, Tabela 7).

5.2.6 Influência de outros fatores sobre o delta Tempo

Como descrito anteriormente, o delta Tempo foi utilizado para estas análises como variável resposta, assumindo que as respostas são similares entre os genótipos e variam apenas entre as condições. Ademais, os participantes de genótipo AC e CC foram agrupados devido ao reduzido número de indivíduos CC. Nenhum efeito ou interação foi encontrado entre condição, genótipo e 1) o que o participante acreditou ter tomado (todos $p \geq 0,3$); 2) lipídios (g/kg MC, todos $p \geq 0,2$); 3) proteínas (g/kg MC, todos $p \geq 0,06$); 4) horário do dia (todos $p \geq 0,26$); ou 5) o somatório de efeitos psicológicos (todos $p \geq 0,1$). Para consumo habitual de caféina, foi observado apenas um efeito de interação (consumo habitual * condição, $p = 0,004$). Contudo, nenhum dos *slopes* foi significativo (**PLACEBO**: $+0,01$ s / mg · kg M.C.; IC 95%: -1,67; 1,70; $p = 0,99$; **CAF3**: $+1,29$ s / mg · kg M.C.; IC 95%: -0,39; 2,98; $p = 0,14$; **CAF6**: $+0,68$ s / mg · kg M.C.; IC 95%: -1,00; 2,36; $p = 0,4$). Para Energia (kcal · kg M.C) e CHO (g · kg M.C), apenas efeitos simples foram observados (ambos $p = 0,02$), sem efeitos de interação (todos $p \geq 0,10$).

Tabela 7. Valores medianos calculados de coeficiente de variação (CV), mínimo e máximo para Energia, Carboidratos, Proteínas e Lipídios ingeridos em g, ou em kcal para Energia, dividido pela massa corpórea.

	Sexo	CV mediano (mín - máx)	Média ± DP
Energia	Masculino	20,5 (7,2 - 51,2)	31,3 ± 11,0
	Feminino	16,8 (8,0 - 31,5)	32,2 ± 8,5
Carboidratos	Masculino	23,5 (4,5 - 58,3)	4,1 ± 1,7
	Feminino	16,9 (6,0 - 42,2)	3,9 ± 1,2
Proteínas	Masculino	28,1 (5,4 - 71,6)	1,4 ± 0,6
	Feminino	23,5 (7,2 - 47,0)	1,5 ± 0,7

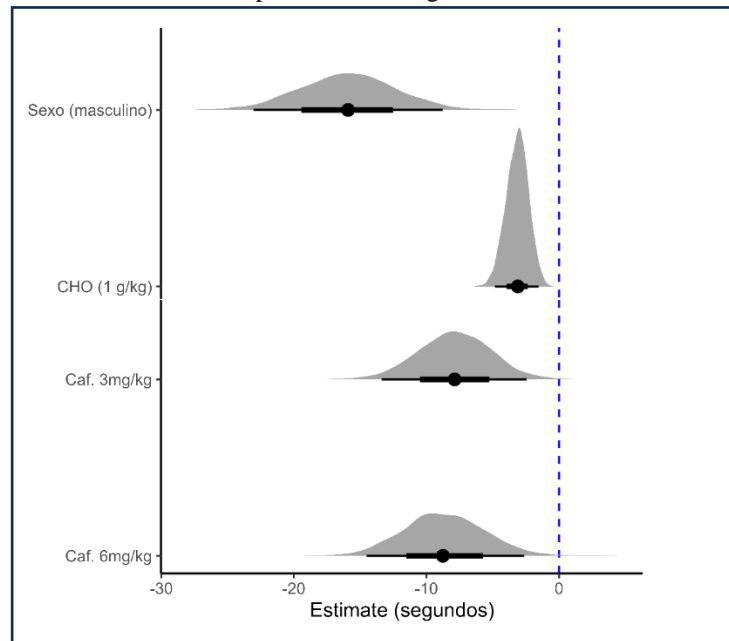
Lipídios	Masculino	32,0 (14,4 - 74,2)	1,0 ± 0,5
	Feminino	27,7 (3,5 - 56,6)	1,2 ± 0,5

Fonte: Tabela criada pelo autor com os dados obtidos no presente trabalho.

5.2.7 Modelo *stepwise* com imputação múltipla e reamostragem

Após a inclusão de todos os fatores, apenas os valores de *baseline* (100% de valores $p < 0,05$) e o consumo de CHO por kg de massa corpórea (99% de valores $p < 0,05$) obtiveram um percentual de valores de p significantes acima de 50%. No modelo final, excluídos os fatores não-significantes, nenhum dos coeficientes dos genótipos tiveram frequência de valores de p significantes maior que 50%, enquanto para o consumo de CHO a frequência foi de 99,8%. Além do efeito dos valores de *baseline* e os efeitos das intervenções (significantes), as distribuições dos efeitos calculados para CHO/kg podem ser vistas na Figura 11. Os coeficientes médios, os intervalos de credibilidade e as probabilidades (p [efeito > 0]) de efeito maior que zero (i.e., quantos dos *estimates* calculados foram maiores que 0) estão descritos na Tabela 8.

Figura 11. Distribuição dos efeitos encontrados nos 5000 modelos estimados para as variáveis que tiveram valor de probabilidade significativa.



Fonte: Figura criada pelo autor com os dados obtidos no presente trabalho.

Tabela 8. *Estimates* médios, intervalos de credibilidade e valores de p (probabilidade de efeito > 0) calculados após 5000 reamostragem com 5 imputações múltiplas cada.

Variável	<i>Estimate</i>	ICr 95%	p [efeito > 0]
Intercepto	442,81	436,35; 449,08	0,0000
Tempo Baseline (CON)	0,72	0,64; 0,81	0,0000
Sexo (homens)	-15,91	-23,06; -8,79	0,0000
CHO (g/kg)	-3,11	-4,84; -1,56	0,0000
CAF3	-7,87	-13,39; -2,45	0,0020
CAF6	-8,76	-14,50; -2,64	0,0036
Genótipo AC	-6,12	-12,64; 0,55	0,0352
Genótipo CC	3,12	-7,27; 22,08	0,2872
CAF3:Genótipo AC	4,2	-4,76; 13,74	0,1818
CAF3:Genótipo CC	1,17	-18,27; 11,85	0,4326
CAF6:Genótipo AC	1,20	-7,59; 9,77	0,3948
CAF6:Genótipo CC	5,80	-15,12; 19,97	0,2416

Fonte: Tabela criada pelo autor com os dados obtidos no presente trabalho.

6. DISCUSSÃO

6.1 Estudo A

Neste estudo, que avaliou as diferenças nos efeitos psicofisiológicos da cafeína em uma dose de 3 mg/kg massa corpórea ao longo do tempo, não foram detectadas diferenças significantes entre os genótipos CYP1A2. A AUC de sintomas físicos e psicológicos ao longo do período de 24 horas avaliados foram similares entre os genótipos, sem diferenças no valor máximo obtido ou no tempo até atingir o pico do efeito. Carrear o alelo C também não afetou a pressão arterial sistólica, a diastólica e a frequência cardíaca ao longo do período. Também, não houve diferença no consumo habitual de cafeína avaliado pelo QFA e na intensidade dos sintomas habituais relacionados ao consumo de cafeína (Q-HAB) entre os genótipos. Por fim, o efeito do consumo habitual sobre as medidas psicofisiológicas foi igualmente indetectável entre os genótipos.

A cafeína tem a capacidade de intensificar a excitação em regiões relacionadas ao estado de alerta (WU; LIEN; CHANG; YANG, 2014), podendo levar à ocorrência de sintomas como ansiedade, agitação, pensamento e fala acelerados e aumento da motivação (SALAMONE; CORREA; RANDALL; NUNES *et al.*, 2013). Hipotetizamos que, devido às diferenças de afinidade entre a cafeína e seus metabólitos com os receptores de adenosina (BENOWITZ; JACOB; MAYAN; DENARO, 1995), os efeitos fisiológicos da cafeína seriam mais intensos para indivíduos AA, ou metabolizadores rápidos, comparados com os carreadores do alelo C (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021). Contudo, neste trabalho, a AUC dos sintomas psicológicos ao longo do tempo foi similar entre os genótipos. Também, os aumentos ocorreram em magnitudes similares entre os genótipos, atingindo o seu valor máximo, de 10,0 (95% CI: 4,4; 15,7) para metabolizadores rápidos (AA) e 10,6 (95% CI: 4,2; 17,0) para os lentos (ACCC), em 1 hora e 23 minutos e 1 hora e 19 minutos, respectivamente. Estes resultados têm alta correlação com os valores medianos de sintomas habituais avaliados pelo questionário, que também não foram afetados pelo polimorfismo. Ainda, não houve impacto do consumo habitual de cafeína sobre seus efeitos psicológicos agudos, sugerindo uma ausência de efeito de adaptação, mesmo entre os genótipos. Apesar de alguns estudos sugerirem adaptações neuronais ao consumo crônico de cafeína (LIN; WEIBEL; LANDOLT; SANTINI *et al.*, 2023), com concomitante redução da potência do seu efeito excitatório no foco e atenção (SMITH; RAFFERTY; LINDGREN; SMITH *et al.*, 1992), não se sabe se este efeito adaptativo também se aplica à ocorrência ou intensidade dos sintomas psicológicos. Ainda, em nosso estudo, foi

solicitado aos participantes que se abstivessem do consumo de cafeína nas 24 horas anteriores aos testes, e não se sabe se isto é suficiente para reduzir o impacto do consumo habitual sobre nossos resultados. Sendo assim, os resultados obtidos não suportam a ideia de que haja uma influência do genótipo sobre a intensidade dos efeitos agudos da cafeína, sobre o tempo até que o máximo do efeito seja obtido, ou sobre a duração destes efeitos em diversos níveis de consumo habitual.

Além dos sintomas psicológicos, alguns indivíduos podem relatar sintomas físicos, muitas vezes indesejáveis, ao consumir cafeína. Os efeitos físicos aqui investigados, que incluíam sintomas cardíacos, musculares e gastrointestinais, são os mais comumente relatados após o consumo agudo de cafeína (JAMES; CROSBIE; PAULL, 1987). Apesar de não termos obtido aumentos significantes na frequência cardíaca em repouso, em concordância com parte da literatura (GLAISTER; LYTHGOE; KAMATH, 2024), ou na pressão arterial, um terço dos participantes relataram uma percepção de alterações no ritmo cardíaco como taquicardia ou sensação de coração pulando batidas (8 de 24). Um viés de interocepção pode ter ocorrido com o uso de cafeína, ou seja, a percepção pode ter sido afetada sem alterações fisiológicas reais (MAI-LIPPOLD; DETTLINGER; KHALSA; POLLATOS, 2021). Em indivíduos mais suscetíveis, com traços de personalidade ansiosos, isto pode justificar a disparidade entre sensação de coração acelerado e os valores de frequência cardíaca (PARROTTA; BACH; PERRUCCI; COSTANTINI *et al.*, 2024). Três participantes também relataram sintomas musculares como tremores e contrações involuntárias. Estes sintomas podem estar relacionados com estados de ansiedade (BEHNKE; BEATTY; KITCHENS, 1978), no caso dos tremores, ou com sua capacidade indireta de causar potenciais platô (*plateau*) nos neurônios motores através do aumento das concentrações de serotonina e noradrenalina (WALTON; KALMAR; CAFARELLI, 2002), ocasionando contrações musculares involuntárias. Além destes, cinco indivíduos relataram sintomas de desconforto gástrico (4) e queimação no peito (1, azia). Apesar da capacidade da cafeína em aumentar a secreção de ácido clorídrico na luz gástrica (LISZT; LEY; LIEDER; BEHRENS *et al.*, 2017), bebidas consideradas fonte de cafeína (e.g., café e chá) podem reduzir o tônus do esfíncter esofágico inferior independentemente da presença de cafeína na preparação, ou seja, também em preparações descafeinadas (NEHLIG, 2022; VAN DEVENTER; KAMEMOTO; KUZNICKI; HECKERT *et al.*, 1992). Apesar de se acreditar que estes sintomas podem ser agravados pelo consumo crônico de cafeína, a literatura é inconclusiva a respeito do seu papel nas doenças gastroesofágicas (NEHLIG, 2022). É possível que os sintomas gastrointestinais relatados não tenham tido relação direta com a

cafeína e possam ter sido causados por alterações na rotina alimentar dos participantes, por exemplo. Devido à baixa frequência dos sintomas físicos nas categorias mencionadas, decidimos pela análise da soma de efeitos físicos totais. Deste modo, nossos resultados sugerem que, na dose de 3 mg/kg de massa corpórea, os sintomas físicos avaliados são infrequentes e que, além disso, parecem não sofrer influência do genótipo ou do consumo habitual de cafeína quanto à intensidade ou duração.

No sistema cardiovascular, os efeitos da cafeína estão relacionados à sua capacidade de inibir os efeitos vasodilatadores da adenosina (RIKSEN; SMITS; RONGEN, 2011), o que poderia levar a aumentos na pressão arterial, com consequentes reduções na frequência cardíaca. A cafeína também aumenta concomitantemente a liberação de adrenalina e noradrenalina (BEAUDOIN; GRAHAM, 2011), o que resulta, muitas vezes, em aumentos na frequência cardíaca. No presente trabalho, foi observado efeito simples de tempo para os valores de pressão arterial, o que sugere que pode ter havido mudanças nestes valores ao longo do tempo, causados pela cafeína ou não. Contudo, estas diferenças foram similares entre os genótipos, com reduções na pressão arterial sistólica e diastólica no tempo de 24 horas, não sendo possível detectar, assim, efeito simples ou interação do fator genótipo com o tempo em nenhuma das variáveis cardiovasculares avaliadas. Estes resultados estão de acordo com o que foi encontrado em YOSHIHARA; ZAITSU; SHIRAIISHI; ARIMA *et al.* (2019), com mudanças similares de pressão arterial após consumo de 200 mg de cafeína entre indivíduos de genótipo CC e AA/AC. Nas análises estratificadas por consumo habitual de cafeína, os autores encontraram um efeito diferencial entre estas combinações alélicas apenas para indivíduos com baixo consumo habitual de cafeína (≤ 90 mg/dia ou, de acordo com os autores, consumo menor ou igual a 1 xícara de café por dia), mas contavam com apenas 4 indivíduos de genótipo CC contra 40 AA/ACs. De forma similar, SOARES; SCHNEIDER; VALLE e SCHENKEL (2018) também não encontraram diferenças nas respostas cardiovasculares agudas entre os genótipos ($p = 0,8$) e, nas análises estratificadas por consumo habitual, não foi encontrado efeito de interação com genótipo ($p = 0,8$). No presente trabalho, o consumo habitual foi incluído nos modelos estatísticos como variável contínua corrigida pela massa corpórea dos participantes (mg/dia/kg massa corpórea), não tendo sido encontrado efeito simples do consumo habitual ou em interação com genótipo. Assim, fornecemos mais evidências sugerindo que, em indivíduos jovens do sexo masculino, não há efeito do genótipo sobre os efeitos agudos da cafeína, ou do consumo habitual de cafeína sobre variáveis cardiovasculares.

Este trabalho tem, no momento, limitações importantes que devem ser observadas. Os resultados aqui apresentados são desfechos secundários de um estudo que pretende avaliar a cinética plasmática da cafeína e seus metabólitos ao longo do tempo. Portanto, as variáveis avaliadas não são comparadas com uma condição controle, ou seja, desconhecemos como estas variáveis se comportariam na ausência de cafeína. Também, as medidas *baseline* (T_0) das variáveis cardiovasculares foram obtidas após 1 hora da refeição padronizada (T_{-1h}) e podem ter sido afetadas pelas alterações hormonais e metabólicas do momento pós-prandial (TAYLOR; CURRY; MATZEK; JOYNER *et al.*, 2014). Mesmo tendo incluído nas análises apenas os pontos no tempo em que havia um intervalo mínimo de 2 horas desde a última refeição, não é possível garantir que as variáveis houvessem retornado aos valores normais, congruentes com um período jejum. O fato de termos incluído refeições ao longo das 24 horas aumenta a validade ecológica do estudo, reproduzindo como estas variáveis se comportariam ao longo do dia em indivíduos saudáveis. Além disso, durante as visitas, todos os indivíduos realizaram refeições idênticas, separadas pelos mesmos intervalos, o que possibilita comparações mais parelhas entre eles. Alguns dos participantes (5 dos 24) consumiram quantidades pequenas de alimentos da categoria dos vegetais crucíferos nas 24 horas que antecederam as visitas, o que poderia aumentar a atividade da enzima CYP1A2 artificialmente (PETERSON; SCHWARZ; LI; LI *et al.*, 2009). Contudo, as quantidades foram pequenas em comparação às fornecidas no estudo de PETERSON; SCHWARZ; LI; LI *et al.* (2009). Uma análise de sensibilidade foi realizada com o consumo de crucíferos (variável dicotômica: sim ou não) nos modelos estatísticos, não tendo afetado nenhum dos resultados (todos $p > 0,6$).

Outro ponto a se considerar é que os resultados deste trabalho se referem apenas a indivíduos jovens do sexo masculino, não devendo ser extrapolados para outras populações. Há evidência de diferenças entre indivíduos de sexo masculino e feminino, com menor atividade enzimática em indivíduos do sexo feminino (OU-YANG; HUANG; WANG; XIE *et al.*, 2000) e um efeito inibitório do uso de contraceptivos orais (HILLI; KORHONEN; TURPEINEN; HOKKANEN *et al.*, 2008) na atividade da enzima CYP1A2. Apesar de não haver aparente diferença na atividade enzimática entre indivíduos jovens e idosos (GUNES; OZBEY; VURAL; ULUOGLU *et al.*, 2009; SIMON; BECQUEMONT; HAMON; NOUYRIGAT *et al.*, 2001), ainda não se sabe o impacto do polimorfismo estudado nestas populações. Mais importante, ainda não obtivemos os resultados das análises plasmáticas de cafeína, metabólitos, adenosina e catecolaminas planejadas. Isto nos impede de observar o impacto real do genótipo estudado sobre as medidas objetivas relacionadas à expressão da enzima citocromo p450 1A2.

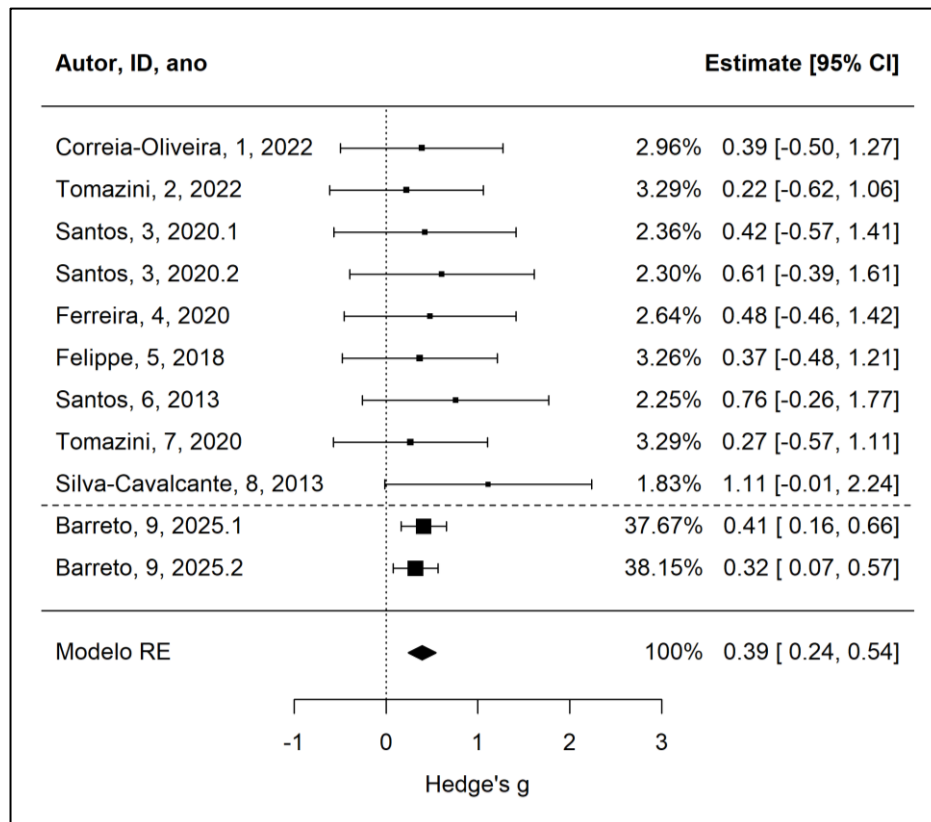
6.2 Estudo B

No Estudo B os genótipos CYP1A2 não afetaram as respostas agudas à cafeína, sejam elas psicofisiológicas (FC, PSE e Lactato) ou de desempenho esportivo (tempo e potência média). Os modelos estimaram que, enquanto os rápidos metabolizadores (AA), ao receberem cafeína na dosagem de 3 ou 6 mg/kg de massa corpórea, mudaram seu tempo de contrarrelógio de 4 km em -7,13 segundos e -8,12 segundos em comparação com a condição placebo, os metabolizadores intermediários (AC) melhoraram -3,58 segundos e -6,92 segundos. Os metabolizadores lentos (CC), por sua vez, melhoraram -4,80 segundos e -4,75 segundos em comparação com a condição placebo. Apesar dos valores de probabilidade (p) não terem atingido significância na condição CAF3 para os carreadores do alelo C (ACs e CCs) e na condição CAF6 para os homozigotos CC, a magnitude do efeito (em segundos) estimada pelo modelo parece ser similar entre todas as combinações alélicas. Além disso, aumentos similares na potência média foram observados entre os genótipos, assim como em medidas fisiológicas como FC, PSE e lactato sanguíneo e da relação potência/PSE em ambas as doses de 3 e 6 mg/kg. Em paralelo, a intensidade dos sintomas físicos e psicológicos não variou entre os genótipos em quaisquer doses comparados com a condição placebo.

Sem considerar o efeito do genótipo, nossos resultados vão ao encontro do que já está descrito no que se refere o efeito da cafeína em contrarrelógios de 4 km. Ao meta-analisar os trabalhos já existentes (dado não publicado, Figura 12), observamos que os efeitos da cafeína encontrados no presente trabalho não estão distantes dos comumente encontrados na literatura para este teste (tamanhos de efeito médios de 0,22 a 1,11) (CORREIA-OLIVEIRA; LOPES-SILVA, 2023; FELIPPE; FERREIRA; LEARSI; BOARI *et al.*, 2018; FERREIRA VIANA; TRAJANO; UGRINOWITSCH; OLIVEIRA PIRES, 2020; SANTOS; FELIPPE; FERREIRA; LEARSI *et al.*, 2020; SANTOS RDE; KISS; SILVA-CAVALCANTE; CORREIA-OLIVEIRA *et al.*, 2013; SILVA-CAVALCANTE; CORREIA-OLIVEIRA; SANTOS; LOPES-SILVA *et al.*, 2013; TOMAZINI; SANTOS-MARIANO; ANDRADE-SOUZA; SEBEN *et al.*, 2020; TOMAZINI; SANTOS-MARIANO; DOS; COELHO *et al.*, 2022). Entretanto, para a interação com os genótipos ainda há controvérsia. Como demonstrado em nossa meta-análise previamente publicada (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024), os efeitos da cafeína no desempenho esportivo são, resumidamente, pequenos e positivos para os metabolizadores rápidos (tamanho de efeito AAs = 0,30, 95% CI: 0,21; 0,39), muito pequenos para metabolizadores intermediários (tamanho de efeito ACs = 0,16, 95% CI: 0,06; 0,25) e pequenos e negativos para os metabolizadores lentos (tamanho de efeito CCs -0,22, 95%

CI: -0,44; -0,01). Contudo, em grande parte, estes efeitos sofrem influência de estudos com alto risco de viés e/ou declarado conflito de interesses e, quando estes estudos são excluídos, as diferenças entre genótipos não são mais detectadas (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024). Esta meta-análise também indicou que estudos com conflito de interesse tendiam, em média, a reportar efeitos ergolíticos mais extremos para indivíduos carreadores do genótipo CC, mas não AA. Isto é problemático porque, devido à baixa frequência de indivíduos de genótipo CC, a grande maioria dos trabalhos não conseguiu separá-los em um grupo único. Nestes estudos menores, os resultados, por vezes, apontaram benefícios para homozigotos AA (RAHIMI, 2019; WOMACK; SAUNDERS; BECHTEL; BOLTON *et al.*, 2012) e por vezes para carreadores do alelo C (PATAKY; WOMACK; SAUNDERS; GOFFE *et al.*, 2016; SALINERO; LARA; RUIZ-VICENTE; ARECES *et al.*, 2017). Hipoteticamente, caso haja realmente uma diferença importante entre homozigotos CC e heterozigotos AC, esta pode estar ‘diluída’ quando um grupo de carreadores do alelo C é formado (AC/CC). Isso poderia justificar a ausência de efeito do genótipo na grande maioria dos estudos realizados até o momento sobre o tema (ALGRAIN; THOMAS; CARRILLO; RYAN *et al.*, 2016; CARSWELL; HOWLAND; MARTINEZ-GONZALEZ; BARON *et al.*, 2020; COURTNEY S. KLEIN, 2012; GIERSCH; BOYETT; HARGENS; LUDEN *et al.*, 2018; GLAISTER; CHOPRA; DE SENA; STERNBACH *et al.*, 2021; GRGIC; PICKERING; BISHOP; SCHOENFELD *et al.*, 2020). De todo modo, a evidência existente até o momento sugere que não há uma importante influência do genótipo CYP1A2 sobre os efeitos da cafeína no desempenho esportivo.

Figura 12. Gráfico *forest* dos efeitos da cafeína nos trabalhos previamente publicados utilizando os testes de contrarrelógio de 4 km, incluindo os obtidos neste trabalho (Barreto). “Barreto, 9, 2025.1” se refere aos resultados na dose de 6 mg/kg, enquanto “Barreto, 9, 2025.2” reflete a dose de 3 mg/kg.



Fonte: Figura criada pelo autor com os dados obtidos no presente trabalho.

O presente estudo obteve tamanho amostral comparável às outras quatro grandes publicações, que incluem GUEST; COREY; VESCOVI e EL-SOHEMY (2018), SICOVA; GUEST; TYRRELL e EL-SOHEMY (2021), WONG; MARSHALL; SICOVA; GUEST *et al.* (2021) e SPINELI; PINTO; DOS SANTOS; LIMA-SILVA *et al.* (2020), com tamanhos amostrais próximos de 100 indivíduos. Destes, três (GUEST; COREY; VESCOVI; EL-SOHEMY, 2018; SICOVA; GUEST; TYRRELL; EL-SOHEMY, 2021; WONG; MARSHALL; SICOVA; GUEST *et al.*, 2021) declaram conflito de interesse e foram classificados como tendo alto risco de viés, sendo excluídos da meta-análise (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024) e são provenientes do mesmo desenho experimental. A amostra destes três trabalhos contava com atletas de modalidades diversas, incluindo de maratonistas a levantadores de peso olímpico, que foram submetidos a testes de força, potência e ciclismo no mesmo desenho experimental. Em amostras com maior diversidade, espera-se uma maior heterogeneidade das medidas obtidas e das respostas às

intervenções, o que pode levar a um maior risco de erro (JAGER; PUTNICK; BORNSTEIN, 2017).

Ainda, a ausência de sessões de familiarização nestes estudos pode ter contribuído para o aumento das variâncias intra-individuais, levando também a um potencial efeito de aprendizagem (HIBBERT; BILLAUT; VARLEY; POLMAN, 2017). No caso de GUEST; COREY; VESCOVI e EL-SOHEMY (2018), os participantes realizaram um contrarrelógio de ciclismo de 10-km sem a realização de familiarização, resultando em efeito negativo para participantes de genótipo CC em doses de 4 mg/kg (+2,5 minutos no contrarrelógio, $p = 0,04$). Não coincidentemente, GUEST; COREY; VESCOVI e EL-SOHEMY (2018) também detectaram um efeito de ordem em suas análises. Os outros dois trabalhos advindos desta mesma intervenção (SICOVA; GUEST; TYRRELL; EL-SOHEMY, 2021; WONG; MARSHALL; SICOVA; GUEST *et al.*, 2021) encontraram resultados na mesma direção, com melhora do desempenho em participantes AA, nenhuma diferença para ACs e redução do desempenho em grande parte dos testes de força e potência para CCs. Em alguns destes casos, diferenças intra-indivíduo implausíveis foram observadas entre as condições para participantes de todos os genótipos, o que também nos levou a questionar seus achados (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; SAUNDERS, 2022). Apesar de não ser possível atribuir os efeitos negativos encontrados exclusivamente à ausência da familiarização, também não é possível excluir seus efeitos potenciais nos resultados encontrados.

Já em SPINELI; PINTO; DOS SANTOS; LIMA-SILVA *et al.* (2020), a amostra contou com atletas adolescentes de modalidades como voleibol (23%), futebol (61%) e atletismo (16%). Apesar disto, os testes realizados eram inespecíficos, ou seja, aplicáveis a todos os tipos de prática esportiva. Ademais, a inclusão de uma sessão de familiarização com os testes de desempenho em seu protocolo traz alguma confiança de que seus desfechos sofreram menos com o viés de aprendizagem e com a heterogeneidade da amostra. Neste caso, não foi observado impacto dos genótipos CYP1A2 no efeito da cafeína sobre testes de força de preensão palmar, agilidade, salto contramovimento, salto *spike*, número de repetições de flexão de tronco (abdominais), flexão de braço e teste Yo-Yo de recuperação intermitente 1 (Yo-Yo IR1). Já no presente trabalho, uma amostra de ciclistas treinados foi escolhida especificamente para que obtivéssemos a menor influência possível da variabilidade interindividual nas respostas. Todos os participantes tinham ao menos 1 ano de experiência em ciclismo, com valores de $VO_{2\text{pico}}$ de pelo menos 45 mL/kg/min para homens e 37 mL/kg/min para mulheres, além de todos terem realizado duas sessões de familiarização antes do primeiro teste principal. Pode-se afirmar,

então, que os valores aqui demonstrados estão menos suscetíveis a erro sob este aspecto. Na Tabela 9 pode-se ver que os tamanhos de efeito encontrados no presente trabalho são comparáveis aos da recente meta-análise (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024), quando apenas estudos com menor risco de viés (baixo e moderado) foram incluídos. Ainda assim, parece haver ainda uma disparidade nos tamanhos de efeito entre os genótipos.

Tabela 9. Tamanhos de efeito observados em meta-análise, excluindo estudos com alto risco de viés, comparados com os tamanhos de efeito encontrados neste trabalho.

Genótipo	Tamanho de efeito MA (IC 95%)	N (% total)	Dose (mg/kg)	Tamanho de efeito (IC 95%)	N (% total)
AA	0,24 (0,14; 0,35)	200 (50,8%)	3	0,44 (0,08; 0,80)	37
			6	0,50 (0,14; 0,86)	(40,7%)
AC	0,17 (0,06; 0,28)	172 (43,6%)	3	0,23 (-0,12; 0,59)	47
			6	0,44 (0,09; 0,81)	(51,6%)
CC	0,05 (-0,22; 0,33)	22 (5,6%)	3	0,11 (-0,24; 0,47)	7 (7,7%)
			6	0,11 (-0,25; 0,47)	

Fonte: Tabela criada pelo autor com os dados de BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.* (2024) e atualizada com os resultados deste trabalho e daqueles obtidos em GUNTORO AJI; MELITA; DIJAYA; SUBALI *et al.* (2023).

As diferenças encontradas para os genótipos CC podem ser justificadas pelo fato de as estimativas terem sido calculadas com resultados de grupos com baixo tamanho amostral (~10% na população (SACHSE; BROCKMOLLER; BAUER; ROOTS, 1999) ou 7,7% na presente amostra), o que as torna mais propensas a erro aleatório (ABT; BOREHAM; DAVISON; JACKSON *et al.*, 2020). Por outro lado, quando efeitos mais próximos dos reais são observados, devido às disparidades nos tamanhos amostrais entre os genótipos, os efeitos de grupos com um número menor de participantes podem ser subestimados. Isto porque cálculos de tamanho de efeito como as diferenças médias padronizadas (SMD) levam em conta

também a dispersão (desvio padrão) dos valores obtidos (LAKENS, 2013) e quanto maior o valor do desvio padrão, menor resulta o tamanho de efeito calculado. De acordo com o teorema do limite central, em amostras representativas com distribuição normal, quanto menor o tamanho amostral, mais larga tende a ser a estimativa de sua variância. Em suma, a evidência existente ainda não nos permite concluir se as diferenças entre genótipos são reais. Caso sejam, é possível conjecturar que estas sejam pequenas e que, nos trabalhos em que um grande efeito negativo da cafeína foi observado para os CCs, as diferenças sejam oriundas de erro.

É ainda plausível que estes contrastes no desempenho físico estejam relacionados às diferenças fenotípicas. Como hipotetizado anteriormente (BARRETO; GRECCO; MEROLA; REIS *et al.*, 2021), é possível que metabolizadores lentos (CCs) demorem mais tempo para atingir altas concentrações dos metabólitos da cafeína. Isto pode refletir em uma menor intensidade dos seus efeitos agudos nesta população, ou em uma alteração no tempo ideal para consumir cafeína antes de uma sessão de exercícios (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024). De fato, a recente meta-análise apontou para uma importante influência do *timing* da suplementação para indivíduos CC (BARRETO; ESTEVES; MARTICORENA; OLIVEIRA *et al.*, 2024), sugerindo maiores benefícios para esta população entre 90 a 120 minutos após suplementação, em contraste com o intervalo mais utilizado na literatura, de 60 minutos. GUNTORO AJI; MELITA; DIJAYA; SUBALI *et al.* (2023) encontraram resultados nesta direção, sugerindo também que carreadores do alelo C (metabolizadores intermediários e lentos) obtém maiores benefícios após 2 horas da suplementação, enquanto homozigotos AA se beneficiam em maior intensidade após 1 hora.

Logo, pode ser que os resultados de baixo ES para o grupo CC possam ter ocorrido em função da menor concentração dos metabólitos da cafeína e então menor efeito ergogênico. Assim como grande parte da literatura, este estudo carece de medidas plasmáticas de cafeína e metabólitos no momento da realização dos testes físicos, o que poderia nos auxiliar a justificar as diferenças. Sugerimos que novas investigações sejam realizadas com fim de avaliar as mudanças nos efeitos da cafeína entre os genótipos ao longo do tempo em medidas de desempenho e capacidade física, como a avaliada por GUNTORO AJI; MELITA; DIJAYA; SUBALI *et al.* (2023). Outra opção igualmente viável é investigar a utilização de paraxantina isoladamente, como o realizado em YOO; XING; GONZALEZ; JENKINS *et al.* (2024). Se a hipótese estiver correta, não haverá diferenças nos efeitos da suplementação de paraxantina entre os genótipos e, se houver, estas diferenças devem estar relacionadas a outros fatores, que não o genótipo.

Apesar da melhora no desempenho físico e dos aumentos de FC e lactato pós-exercício (não significativo) proporcionais, não foram observadas diferenças na PSE entre as condições PLA, CAF3 e CAF6. Espera-se que estas três medidas estejam correlacionadas, de modo que um aumento na intensidade do exercício aumentará a FC média, as concentrações de lactato e a PSE de maneira proporcional (BORG; HASSMEN; LAGERSTROM, 1987). Em relação à FC, nossos achados estão congruentes com a literatura, sugerindo que a cafeína, em doses consideradas ergogênicas, pode aumentá-la em testes de contrarrelógio (GLAISTER; MOIR, 2019), em contraste com exercícios submáximos controlados (GLAISTER; GISSANE, 2018). Para lactato, a inclusão dos valores pré-exercício como covariável, em adição aos valores da condição controle, pode ter reduzido a sensibilidade do modelo, aumentando o risco de erro do tipo II. Apesar dos resultados não-significantes, a direção do efeito seguiu, de modo geral, o mesmo padrão da FC, com aumentos em todas as condições em que cafeína era administrada, o que é esperado em contrarrelógios (GLAISTER; MOIR, 2019). Isto se dá, provavelmente, devido a um aumento na utilização da via glicolítica anaeróbia, o que já foi observado em outros trabalhos (SANTOS; FELIPPE; FERREIRA; LEARSI *et al.*, 2020; SANTOS RDE; KISS; SILVA-CAVALCANTE; CORREIA-OLIVEIRA *et al.*, 2013). Quanto aos valores de PSE, sabe-se que para exercícios autocontrolados com distância ou tempo determinados, como é o caso de um contrarrelógio, estes são menos influenciados por intervenções com cafeína (DOHERTY; SMITH, 2005). Isto porque, nestes testes, os indivíduos tendem a realizar esforços de acordo com sua percepção de capacidade (ou reserva de energia), baseando sua estratégia de *pacing* e suas respostas sobre a PSE em 1) sua percepção de fadiga e 2) na duração do restante do teste (SWART; LAMBERTS; LAMBERT; LAMBERT *et al.*, 2009). Deste modo, espera-se que os valores de PSE sejam iguais ou extremamente similares entre as condições ao longo do tempo (ou distância). Uma relação simples entre a potência média e a PSE foi calculada (Potência/PSE), resultando em uma maior geração de potência por incremento de PSE na condição CAF6 comparada com a condição PLACEBO, sem diferença na condição CAF3. Compreende-se que a cafeína possibilitou um melhor desempenho sem afetar os valores de PSE, ou melhor, que a capacidade de produzir força foi maior para a mesma percepção de esforço. Outros trabalhos que investigaram o efeito da cafeína entre os genótipos em contrarrelógios falharam em identificar quaisquer diferenças na PSE após a ingestão de cafeína (DAVENPORT; JAMESON; KILROE; MONTEYNE *et al.*, 2020; PUENTE; ABIANVICEN; DEL COSO; LARA *et al.*, 2018; SPINELI; PINTO; DOS SANTOS; LIMA-SILVA *et al.*, 2020; WOMACK; SAUNDERS; BECHTEL; BOLTON *et al.*, 2012), incluindo aqueles em que uma piora no desempenho com cafeína foi observada (GUEST; COREY; VESCOVI;

EL-SOHEMY, 2018). Deste modo, compreende-se que a cafeína não impacta a PSE nos testes de contrarrelógio, mas pode influenciar a relação Potência/PSE, a FC e os valores de lactato pós-exercício independentemente dos genótipos CYP1A2.

Neste trabalho, os genótipos CYP1A2 não influenciaram significativamente a intensidade dos efeitos físicos e psicológicos secundários ao consumo de cafeína. Ademais, a intensidade dos efeitos secundários ao consumo de cafeína não estava em correlação com as mudanças no desempenho. Considerando os pequenos efeitos periféricos da cafeína sobre o músculo esquelético (DODD; HERB; POWERS, 1993) e sobre a oxidação de lipídios (TARNOPOLSKY, 1994), acredita-se que o seu impacto sobre o desempenho esportivo esteja relacionado principalmente aos seus efeitos excitatórios no sistema nervoso central (DAVIS; ZHAO; STOCK; MEHL *et al.*, 2003). Deste modo, caso houvesse alguma influência dos genótipos sobre estes efeitos, eles seriam detectados através de diferenças na intensidade dos sintomas. Dos estudos que avaliaram a ocorrência destes sintomas os genótipos (GRGIC; PICKERING; BISHOP; SCHOENFELD *et al.*, 2020; MUNOZ; LOPEZ-SAMANES; AGUILAR-NAVARRO; VARILLAS-DELGADO *et al.*, 2020; PUENTE; ABIAN-VICEN; DEL COSO; LARA *et al.*, 2018; SALINERO; LARA; RUIZ-VICENTE; ARECES *et al.*, 2017), apenas MUNOZ; LOPEZ-SAMANES; AGUILAR-NAVARRO; VARILLAS-DELGADO *et al.* (2020) encontrou qualquer diferença significativa entre os genótipos, com maior prevalência de insônia para carreadores do alelo C em comparação com AAs (64,7% vs. 28,6%). A insônia afetou, em contrapartida, 70% dos AAs e apenas 33% dos carreadores do alelo C ($p = 0,06$) em PUENTE; ABIAN-VICEN; DEL COSO; LARA *et al.* (2018). Além destes, GRGIC; PICKERING; BISHOP; SCHOENFELD *et al.* (2020) encontrou diferenças significantes intra-grupo para os carreadores do alelo C na prevalência de sensação de vigor/estar ativo (PLACEBO = 0% vs. CAF3 = 67%) e na percepção de melhora de desempenho (PLACEBO = 11% vs. CAF3 = 100%), enquanto em SALINERO; LARA; RUIZ-VICENTE; ARECES *et al.* (2017), apenas os indivíduos CC (31,1% deles) relataram sentir algum nervosismo. Vê-se que para sintomas secundários ao consumo de cafeína, há também uma importante divisão na literatura. Até o momento, apenas o presente estudo avaliou a intensidade, e não apenas a prevalência, destes efeitos entre os genótipos. Deste modo, a evidência ainda é inconclusiva em relação à influência do polimorfismo CYP1A2 sobre o estado excitatório causado pelo consumo de cafeína. No mais, a percepção destes sintomas parece ser influenciada por outros fatores, que não o genótipo.

Apesar da ausência de efeito estatisticamente significativo sobre os sintomas psicológicos, as sutis diferenças podem ter sido suficientes para facilitar a identificação do tratamento. Com um número superior de participantes respondendo corretamente que tomaram cafeína em visitas em que de fato a receberam – mais notoriamente na condição CAF6 – pode-se dizer que o cegamento não foi eficaz ($\chi^2 = 13,6$, $p = 0,01$). Nossos resultados são similares aos de GRGIC; PICKERING; BISHOP; SCHOENFELD *et al.* (2020), em que 50 a 60% dos participantes identificaram corretamente o tratamento com cafeína. Já era esperado que, como parte dos efeitos da cafeína são perceptíveis e muitas vezes incômodos (SAUNDERS; DE OLIVEIRA; DA SILVA; DE SALLES PAINELLI *et al.*, 2017), uma redução nos índices de cegamento seria observada. Quando calculado o *Blinding Index* de JAMES; BLOCH; LEE; KRAEMER *et al.* (1996), entretanto, foi encontrado um valor de 0,571 (IC 95%: 0,521; 0,621), o que representa que a identificação dos tratamentos não estava acima do que seria esperado caso as escolhas fossem aleatórias (*Blinding Index* $\leq 0,5$). Isto ocorreu em grande parte devido à grande maioria dos participantes terem respondido, na condição CAF6, que acreditavam ter recebido cafeína em dose baixa (3 mg/kg). Quando as respostas ao questionário referentes às condições CAF3 e CAF6 foram unificadas, ou seja, as respostas possíveis eram ‘cafeína’, ‘placebo’ ou ‘não sei’, o valor encontrado de BI foi de 0,53 (IC 95%: 0,42; 0,64). Isto evidencia quebra de cegamento (limite inferior $< 0,5$) e vai ao encontro do que foi encontrado no teste qui-quadrado. Sendo assim, não podemos descartar a existência de efeito placebo (ou nocebo) da identificação dos tratamentos.

O efeito placebo, definido como um efeito real proveniente de uma intervenção inerte, está presente e é um componente do efeito total de todo tratamento (MARTICORENA; CARVALHO; OLIVEIRA; DOLAN *et al.*, 2021). Estima-se que o efeito placebo representa cerca de 49% (Intervalo de Credibilidade 75%: 30%, 77%) dos resultados em intervenções com cafeína no esporte (MARTICORENA; CARVALHO; OLIVEIRA; DOLAN *et al.*, 2021). No presente trabalho, os participantes que corretamente identificaram quando receberam cafeína na condição CAF3 ($R_{CAF-CAF3}$) obtiveram delta Tempo 4,0s maior [IC 95%: -4,9; 12,8] em comparação com quem acreditou ter tomado placebo ($R_{PLA-CAF3}$) ($R_{PLA-CAF3}$: 6,6 s; 95% CI: -4,3; 17,5 vs. $R_{CAF-CAF3}$: 10,6; 95%CI: -7,4; 28,5), um aumento de ~37,7%. Já o delta Tempo daqueles que responderam “não sei” ($R_{NS-CAF3}$: 8,6 s; 95% CI: -2,0; 19,1), foi cerca de 2,0s [IC 95%: -7,4; 11,4] maior que em comparação com quem acreditou ter recebido placebo, o que representa uma diferença de ~23,3%. Esta diferença pode não ser atribuída somente à retirada da expectativa, mas sim a um possível efeito negativo de se acreditar não ter recebido uma

intervenção verdadeira (BINGEL; WANIGASEKERA; WIECH; NI MHUIRCHEARTAIGH *et al.*, 2011). Este efeito, conhecido como nocebo, ou um efeito negativo proveniente de uma intervenção aparentemente danosa, pode ocorrer também quando se acredita que uma intervenção real não proverá benefícios (MEISSNER, 2022). Estas diferenças ocorreram na mesma direção do que foi encontrado em SAUNDERS; DE OLIVEIRA; DA SILVA; DE SALLES PAINELLI *et al.* (2017), em que os participantes que identificaram corretamente o tratamento com cafeína produziram mais potência em um contrarrelógio de ciclismo (~30 minutos a 85% da potência máxima). Efeito similar ocorreu na condição PLACEBO, em que aqueles que acreditaram ter tomado cafeína ($R_{CAF-PLA}$: 4,7 s; IC 95%: -7,9; 17,3) obtiveram um delta Tempo (vs. controle) maior em comparação com quem identificou que uma substância inerte havia sido recebida ($R_{PLA-PLA}$: 2,9 s; IC 95%: -10,4; 16,3). Isto pode ser explicado pelo segundo mecanismo proposto para o efeito placebo: o de condicionamento. Similar ao condicionamento pavloviano, isto é, quando um estímulo, neste caso a ingestão de uma cápsula, é recebido diversas vezes ao longo da vida por um indivíduo, ele está condicionado, inconscientemente, a esperar uma resposta fisiológica (ou psicológica) positiva (RAGLIN; SZABO; LINDHEIMER; BEEDIE, 2020). Pode-se conjecturar, então, que o efeito placebo ocorreu tanto na presença de expectativa positiva (respondeu CAF, recebeu PLA) quanto de expectativa negativa (respondeu PLA, recebeu PLA).

Na condição CAF6, identificar o tratamento corretamente ($R_{CAF-CAF6}$) não aumentou os benefícios da intervenção. Aqueles que obtiveram maiores benefícios nesta condição foram os que não souberam identificar o tratamento ($R_{NS-CAF6}$: 13,9 s; IC 95%: 3,6; 24,3), seguidos por aqueles que o identificaram corretamente ($R_{CAF-CAF6}$: 11,3 s; IC 95%: -8,2; 30,8) e por último os que acreditaram ter recebido placebo ($R_{PLA-CAF6}$: 10,7 s; IC 95%: -0,1; 21,4). É possível hipotetizar que, na condição CAF6, os efeitos das doses mais altas de cafeína tenham se sobreposto aos efeitos da expectativa e reduzido o impacto do efeito placebo sobre o desempenho. Ainda, maiores níveis de sintomas desconfortáveis podem ter levado a menores benefícios ao mesmo tempo em que facilitou a identificação do tratamento. Deve-se ainda atentar ao fato de que três participantes não toleraram os sintomas durante a condição CAF6, um deles tendo solicitado sua retirada do estudo após a realização da sessão de exercício. Deve-se interpretar estes dados com cuidado, já que o questionário não foi realizado antes dos testes de desempenho, como é usualmente recomendado (KOLAHY; BANG; PARK, 2009). A opinião dos participantes, neste caso, pode ter mudado devido à percepção de melhora de desempenho, não pelos sintomas.

Em nossa amostra, o consumo habitual de cafeína não exerceu influência significativa sobre o efeito da suplementação aguda. Entretanto, os maiores efeitos (não significantes) do consumo habitual foram observados na condição CAF3, em comparação com a condição CAF6 e PLA. A direção do efeito foi positiva, ou seja, oposta ao que se observa comumente na literatura (BEAUMONT; CORDERY; FUNNELL; MEARS *et al.*, 2017; LARA; RUIZ-MORENO; SALINERO; DEL COSO, 2019). Além disto, os menores efeitos encontrados para a condição CAF6 nos levam a conjecturar que os intensos efeitos resultantes das dosagens mais altas se sobrepõe à influência do consumo habitual (GONCALVES; PAINELLI; YAMAGUCHI; OLIVEIRA *et al.*, 2017), ou que esta influência não existe. Nossos achados estão de acordo com dados meta-analíticos demonstrando não haver impacto significativo do consumo habitual sobre o efeito ergogênico da cafeína em nenhuma dose, estado de treinamento ou sexo (CARVALHO; MARTICORENA; GRECCO; BARRETO *et al.*, 2022). Mais importante, assim como grande parte da literatura (CARSWELL; HOWLAND; MARTINEZ-GONZALEZ; BARON *et al.*, 2020; GLAISTER; CHOPRA; DE SENA; STERNBACH *et al.*, 2021; GRGIC; PICKERING; BISHOP; SCHOENFELD *et al.*, 2020; SPINELI; PINTO; DOS SANTOS; LIMA-SILVA *et al.*, 2020), o consumo habitual não variou entre os genótipos CYP1A2 (Tabela 4) e foi igualmente desimportante para o efeito da cafeína sobre o desempenho no exercício entre eles. Devemos considerar que os valores de consumo habitual foram obtidos com questionários que, de modo geral, estão sujeitos a *recall bias*, ou seja, podem ser influenciados pela memória do avaliado e pela habilidade do avaliador em aplicá-los (SHIM; OH; KIM, 2014). Deste modo, novos estudos investigando especificamente os impactos do consumo habitual de cafeína devem ser realizados, incluindo estudos 1) em que a ingestão é controlada, e não estimada através de questionários e 2) em que este consumo seja previamente avaliado, incluindo um número de participantes similar entre faixas de consumo preestabelecidas.

O horário do dia também não afetou, de maneira simples ou em interação com genótipo e condição as estimativas do modelo e não modificou os valores de p obtidos para condição ou genótipo. Em nosso modelo, os participantes deveriam realizar os testes sempre nos mesmos horários, isto é, poderia haver variações no horário dos testes entre os participantes, mas não intra-participante. Observa-se que aproximadamente 50% dos participantes realizaram os testes físicos no período da manhã (das 8h às 12h) (manhã: n ~ 45 vs. tarde + noite: ~ 40 (12h às 22h), sendo esperado um maior tamanho de efeito neste caso. Contudo, não foi observada diferença significativa. A importância deste controle se origina de achados na literatura demonstrando

diferenças no desempenho físico (MORA-RODRIGUEZ; PALLARES; LOPEZ-GULLON; LOPEZ-SAMANES *et al.*, 2015) e cognitivo (SOUISSI; SOUISSI; CHTOUROU, 2019) ao longo do dia, com melhor desempenho no período da tarde ou a noite (entre as 16:00 e 20:00 horas) em comparação ao período da manhã. Os efeitos da cafeína parecem ser, de modo geral, maiores no período da manhã em comparação com outros períodos do dia (GRGIC; VAROVIC, 2024; SOUISSI; SOUISSI; CHTOUROU, 2019; STOJANOVIC; SCANLAN; MILANOVIC; FOX *et al.*, 2022), apesar da existência de estudos com resultados contrastantes (MUNOZ; AGUILAR-NAVARRO; RUIZ-MORENO; VARILLAS-DELGADO *et al.*, 2024). Este efeito parece estar atrelado às variações hormonais que ocorrem ao longo do dia (ROBERTSON; PULLINGER; ROBINSON; SMITH *et al.*, 2024) e da regulação da expressão de genes relacionados ao ciclo circadiano no músculo esquelético (MIRIZIO; NUNES; VARGAS; FOSTER *et al.*, 2020). Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a incluir uma análise de interação entre genótipo e horário do dia e, como nenhuma diferença foi encontrada, podemos inferir que o impacto do horário do dia sobre o desempenho obtido após a suplementação de cafeína não é diferente entre os genótipos CYP1A2.

No presente trabalho, o delta Tempo médio foi significativamente afetado pelas variações na ingestão de carboidratos nas 24 horas anteriores aos testes ($p = 0,02$). Esses resultados sugerem que, na ausência de controle alimentar, uma redução no consumo de alimentos fonte de CHO pode reduzir também o desempenho no contrarrelógio, afetando os tamanhos de efeito encontrados. Neste trabalho, solicitamos aos participantes que mantivessem consumo alimentar similar nos dias anteriores aos testes e, ainda assim, uma grande amplitude foi encontrada nos valores de coeficiente de variação para energia e macronutrientes ingeridos, com valores mínimos e máximos entre 3,5 e 74,2%. Podemos afirmar que este tipo de controle, se é que se pode classificar desta maneira, não é suficiente para reduzir a variação no consumo alimentar. Apesar da menção da necessidade de controle alimentar, nenhum dos trabalhos anteriores comparando as diferenças no desempenho entre os genótipos CYP1A2 calculou o consumo alimentar de seus participantes. Isto é potencialmente problemático, já que foi demonstrado que o consumo e a disponibilidade de carboidratos e energia afetam significativamente o desempenho, impactando a eficiência (COLE; COLEMAN; HOPKER; WILES, 2014) e o desempenho em testes de contrarrelógio de ciclismo (CORREIA-OLIVEIRA; BERTUZZI; DAL'MOLIN KISS; LIMA-SILVA, 2013), incluindo o de 4 km (SILVA-CAVALCANTE; CORREIA-OLIVEIRA; SANTOS; LOPES-SILVA *et al.*, 2013). Não é possível garantir que em trabalhos anteriores o consumo alimentar não tenha sido

diferente entre as condições e genótipos, impactando assim seus resultados de desempenho. Sugerimos que trabalhos futuros realizem um controle alimentar mais rigoroso, ou que o consumo alimentar seja registrado nas 24 horas anteriores aos testes físicos, assim como sugerido por REIS; SAUNDERS e DA COSTA (2021). Deste modo, será possível incluir os valores obtidos nos modelos estatísticos como covariáveis, ao menos corrigindo as estimativas produzidas pelas diferenças no consumo alimentar.

O modelo *stepwise* realizado teve como objetivo observar os efeitos cumulativos dos diversos fatores que poderiam estar envolvidos nas mudanças de desempenho observadas. A técnica utilizada para isto foi o de reamostragem *bootstrapping*, que tende a fornecer estimativas e intervalos de confiança mais precisos (HESTERBERG, 2011). Para melhor compreender a utilidade destes modelos, devemos imaginar que os valores encontrados em uma amostra necessariamente estão presentes em uma população. Contudo, 100% das amostras conterão algum viés, ou seja, algum desvio em relação à população da qual foram selecionados. Quando simulamos amostras com reposição, os valores da amostra obtida podem ser selecionados mais de uma vez, o que significa que os valores mais prováveis (ou frequentes) na amostra original terão maior probabilidade de ocorrer nas amostras simuladas. Podemos, assim, reduzir o impacto de valores extremos, obtendo estimativas mais precisas (HESTERBERG, 2011). Além disso, utilizamos também imputações múltiplas no caso de valores faltantes nas amostras simuladas, como sugerido por (SCHOMAKER; HEUMANN, 2018), reduzindo ainda mais, assim, a chance de erro do tipo II. Os resultados do modelo completo (incluindo todas as covariáveis) sugerem que, dos fatores avaliados, apenas o consumo de carboidratos nas 24 horas anteriores aos testes (significante em 99% das vezes) afeta os valores obtidos de forma a serem incluídos em um modelo final. Ao excluir das análises as covariáveis que não afetaram o modelo mais vezes que o ponto de corte definido (50%), o impacto do consumo de CHO continuou significativo em 100% dos modelos combinados. Em relação aos efeitos do genótipo, os resultados do modelo final confirmam a incerteza dos nossos achados, com uma probabilidade de diferença de efeito nas condições CAF3 e CAF6 (diferença calculada > 0) de ~87 e ~88% entre indivíduos de genótipo AA e CC, e de ~69 e 80% entre ACs e CCs. Vê-se que nenhuma das comparações entre os genótipos atingiu um valor de probabilidade maior que o estabelecido (probabilidade $> 95\%$, ou $p \leq 0,05$), ou seja, que esta diferença pode não ser significativa (e/ou significativa). Análises adicionais exploratórias foram realizadas avaliando o efeito da ingestão de CHO em interação com condição, excluindo o fator genótipo, que não foi significativo (i.e., “tempo ~ condição * CHO”). Neste caso, o consumo de CHO, afetou o

desempenho de maneira significativa nas apenas na condição CAF3 (*estimate* médio = -4,30 s/g/kg CHO; ICr 95%: -7,06; -1,57), enquanto na condição PLA (*estimate* médio = -2,10 s/g/kg CHO; ICr 95%: -4,93; 0,01) e CAF6 (*estimate* médio = -2,21 s/g/kg CHO; ICr 95%: -5,19; 0,68), os valores cruzaram o zero, ou seja, não foram significantes ao nível de credibilidade de 95%. Mesmo observando uma diferença no efeito da cafeína entre os genótipos, podemos afirmar, com alguma certeza, que ao contrário do que se acredita, nenhum deles é afetado negativamente pela suplementação. Ademais, outros fatores parecem ser mais importantes para as diferenças observadas, que não o genótipo, como o consumo de carboidratos no dia anterior aos testes.

Apesar dos controles realizados e do substancial tamanho amostral, este trabalho tem algumas limitações. Primeiramente, assim como em todas as publicações anteriores, obtivemos um baixo número de participantes de genótipo raro (CC), já que estes compõem apenas 10% da população. Além das abordagens estatísticas, não há uma solução fácil para o problema da disponibilidade de indivíduos genótipos raros. Uma das possibilidades seria a genotipagem em um momento anterior às coletas de dados, o que é, do ponto de vista de custos, inviável, já que para encontrar o mínimo número recomendado para atingir a distribuição normal ($n = 30$) seria necessário, pelo menos, 300 indivíduos (10%). A utilização do modelo de reamostragem aqui empregado é outra opção mais viável, que pode auxiliar na redução da influência de participantes com valores destoantes da amostra sobre as estimativas. Outras técnicas podem ser utilizadas no futuro em sumários de evidência, como meta-análises de dados individuais, ou análises combinadas (*pooled*) (RILEY; LAMBERT; ABO-ZAID, 2010).

Outra limitação do presente estudo é a realização da genotipagem dos participantes apenas após a realização de todos os testes. Neste caso, os grupos foram formados naturalmente, não através de randomização e, deste modo, não é possível garantir que não haja desequilíbrios entre os participantes de diferentes genótipos. Todos os estudos publicados até o momento realizaram análises estatísticas sem considerar possíveis diferenças nos valores de *baseline*. Isto é ainda mais problemático para combinações alélicas raras como os metabolizadores lentos (CYP1A2 – CC) pelos motivos já descritos acima. Para mitigar este problema, utilizamos uma análise de covariância incluindo os valores de *baseline* (controle ou familiarizações) como covariável (ZHANG; PAUL; NANTHA-AREE; BUCKLEY *et al.*, 2014). Assim, foi possível obter valores de média e erro estimados contando com estas diferenças (EGBEWALE; LEWIS; SIM, 2014). Na ausência de valores controle, o que pode ocorrer quando o participante decide deixar o estudo antes da realização desta sessão, os valores obtidos na familiarização também

podem ser úteis. Neste trabalho, o coeficiente de variação entre as duas visitas de familiarização e a condição controle foi baixo, em mediana, 2,72%, o que nos permitiu utilizar estes valores com segurança. Sugerimos, então que os próximos estudos corrijam as variáveis resposta pelos valores obtidos na condição controle, na familiarização, ou ainda pela medida principal utilizada para caracterização (e.g., $\dot{V}O_2\text{max}$, 1RM etc.).

Também, como descrito na sessão de métodos, apesar de participante e avaliador estarem cegos para o conteúdo das cápsulas, todos os envolvidos estavam cientes da ausência de intervenção na condição controle e da possibilidade de haver cafeína (ou placebo) nas condições em que uma cápsula era recebida. Na impossibilidade de cegamento na condição controle, a ausência de expectativa, ou uma expectativa negativa, pode gerar um efeito nocebo importante (HORVATH; KOTELES; SZABO, 2021). Isso pode ser intensificado ainda mais pela ausência de expectativa positiva por parte dos avaliadores. O mesmo efeito se pode esperar na presença de uma intervenção, inócua ou não. Já foi demonstrado que a ausência de cegamento dos avaliadores pode aumentar o efeito do contexto da intervenção, que tem como componente também o efeito placebo (HAFLIETHADOTTIR; JUHL; NIELSEN; HENRIKSEN *et al.*, 2021). Adicionalmente não investigamos a capacidade dos avaliadores de identificar a intervenção de acordo com os sinais apresentados pelos participantes. Alterações motoras, como o aumento da movimentação (RAPOPORT; JENSVOLD; ELKINS; BUCHSBAUM *et al.*, 1981), por exemplo, podem ter reduzido ainda mais o sucesso do cegamento. Caso a percepção subjetiva do avaliador não fosse acurada o suficiente, auxiliar os participantes no preenchimento do questionário de sintomas relacionados ao uso de cafeína antes da sessão de exercícios pode, novamente, ter afetado sua percepção. Deste modo, a realização de incentivo verbal foi evitada durante os testes de contrarrelógio (MIDGLEY; MARCHANT; LEVY, 2018), mesmo durante as sessões de familiarização, justamente para reduzir a influência dos avaliadores sobre os participantes. Ademais, sugerimos que trabalhos sejam realizados investigando a capacidade dos avaliadores em detectar mudanças no comportamento dos participantes. Principalmente em intervenções agudas com cafeína, é essencial identificar se este fator pode reduzir o sucesso do cegamento.

7. CONCLUSÃO E APLICAÇÕES PRÁTICAS

Em suma, parece não haver uma influência significativa do polimorfismo CYP1A2 A>C sobre os efeitos psicofisiológicos do consumo agudo de 3 e 6 mg de cafeína por kg de massa corpórea ao longo de 24 horas, ou sobre seu impacto nos efeitos físicos e psicológicos percebidos e no desempenho de um contrarrelógio de 4 km de ciclismo após 60 minutos de sua ingestão. Mesmo o polimorfismo não tendo afetado de maneira significativa o desempenho, ainda há uma variabilidade nas repostas, que foi explicada parcialmente pelo consumo de carboidratos nas 24 horas anteriores aos testes, pelo consumo habitual de cafeína e por um possível pequeno e não significativo efeito placebo. Devido aos menores tamanhos de efeito para indivíduos de genótipo CC, novos estudos devem explorar mais profundamente a influência destes fatores, além de outros que possam ser relevantes do ponto de vista teórico, como *timing* da suplementação.

Sendo assim, não é suficiente a evidência para recomendação da realização de testagem genética para o polimorfismo CYP1A2 -164 A>C com fim de justificar a suplementação de cafeína no esporte. Devemos, contudo, recomendar que os atletas evitem a restrição da ingestão de carboidratos nos dias imediatamente anteriores à realização de testes físicos, provas e competições, com fim de, assim, potencializar os efeitos positivos do uso de cafeína. Ainda, na ausência de mais evidências concretas demonstrando a diferença no momento ideal a se consumir cafeína, sugerimos a realização de testes físicos individuais em campo, em diferentes intervalos de tempo entre a suplementação e os testes. Para isto, deve-se controlar fatores como 1) a familiaridade do atleta testado com os exercícios e testes a serem realizados, 2) o consumo alimentar e 3) a intensidade do treinamento no dia anterior aos testes e 4) o horário do dia. Assim, deve ser possível observar, individualmente, o *timing* ideal para suplementação, que deve ser preocupação apenas para homozigotos CC, ou seja, ~10% dos indivíduos.

REFERÊNCIAS

ABT, G.; BOREHAM, C.; DAVISON, G.; JACKSON, R. *et al.* Power, precision, and sample size estimation in sport and exercise science research. **J Sports Sci**, 38, n. 17, p. 1933-1935, Sep 2020.

AGUILAR-NAVARRO, M.; MUNOZ, G.; SALINERO, J. J.; MUNOZ-GUERRA, J. *et al.* Urine Caffeine Concentration in Doping Control Samples from 2004 to 2015. **Nutrients**, 11, n. 2, Jan 29 2019.

ALGRAIN, H. A.; THOMAS, R. M.; CARRILLO, A. E.; RYAN, E. J. *et al.* The effects of a polymorphism in the cytochrome P450 CYP1A2 gene on performance enhancement with caffeine in recreational cyclists. **Journal of Caffeine Research**, 6, n. 1, p. 34-39, 2016.

ARNAUD, M. J. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. **Handb Exp Pharmacol**, n. 200, p. 33-91, 2011.

ARTIOLI, G. G. **Polimorfismo de variação de número de cópias do gene PDLIM3 como candidato para associação com o desempenho esportivo: um estudo exploratório de associação.** 2012. -, Universidade de São Paulo.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends Plant Sci**, 6, n. 9, p. 407-413, Sep 2001.

ASTORINO, T. A.; COTTRELL, T.; TALHAMI LOZANO, A.; ABURTO-PRATT, K. *et al.* Effect of caffeine on RPE and perceptions of pain, arousal, and pleasure/displeasure during a cycling time trial in endurance trained and active men. **Physiol Behav**, 106, n. 2, p. 211-217, May 15 2012.

BARRETO, G.; ESTEVES, G. P.; MARTICORENA, F.; OLIVEIRA, T. N. *et al.* Caffeine, CYP1A2 Genotype, and Exercise Performance: A Systematic Review and Meta-analysis. **Med Sci Sports Exerc**, 56, n. 2, p. 328-339, Feb 1 2024.

BARRETO, G.; ESTEVES, G. P.; MARTICORENA, F. M.; SAUNDERS, B. Comment on "CYP1A2 Genotype Modifies the Effects of Caffeine Compared With Placebo on Muscle Strength in Competitive Male Athletes". **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, 32, n. 1, p. 62-63, Jan 1 2022.

BARRETO, G.; GRECCO, B.; MEROLA, P.; REIS, C. E. G. *et al.* Novel insights on caffeine supplementation, CYP1A2 genotype, physiological responses and exercise performance. **Eur J Appl Physiol**, 121, n. 3, p. 749-769, Mar 2021.

BASHEER, R.; STRECKER, R. E.; THAKKAR, M. M.; MCCARLEY, R. W. Adenosine and sleep-wake regulation. **Prog Neurobiol**, 73, n. 6, p. 379-396, Aug 2004.

BEAUDOIN, M. S.; GRAHAM, T. E. Methylxanthines and human health: epidemiological and experimental evidence. **Handb Exp Pharmacol**, n. 200, p. 509-548, 2011.

BEAUMONT, R.; CORDERY, P.; FUNNELL, M.; MEARS, S. *et al.* Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. **J Sports Sci**, 35, n. 19, p. 1920-1927, Oct 2017.

BEHNKE, R. R.; BEATTY, M. J.; KITCHENS, J. T. Cognitively-experienced speech anxiety as a predictor of trembling. **Western Journal of Speech Communication**, 42, n. 4, p. 270-275, 1978.

BELOTTI, F.; DEB, P.; MANNING, W. G.; NORTON, E. C. twopm: Two-part models. **The Stata Journal**, 15, n. 1, p. 3-20, 2015.

BENOWITZ, N. L.; JACOB, P., 3rd; MAYAN, H.; DENARO, C. Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. **Clin Pharmacol Ther**, 58, n. 6, p. 684-691, Dec 1995.

BINGEL, U.; WANIGASEKERA, V.; WIECH, K.; NI MHUIRCHEARTAIGH, R. *et al.* The effect of treatment expectation on drug efficacy: imaging the analgesic benefit of the opioid remifentanyl. **Sci Transl Med**, 3, n. 70, p. 70ra14, Feb 16 2011.

BORG, G. **Borg's perceived exertion and pain scales**. Human kinetics, 1998. 0880116234.

BORG, G.; HASSMEN, P.; LAGERSTROM, M. Perceived exertion related to heart rate and blood lactate during arm and leg exercise. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, 56, n. 6, p. 679-685, 1987.

BOULENGER, J. P.; PATEL, J.; POST, R. M.; PARMA, A. M. *et al.* Chronic caffeine consumption increases the number of brain adenosine receptors. **Life Sci**, 32, n. 10, p. 1135-1142, Mar 7 1983.

BOYETT, J. C.; GIERSCH, G. E.; WOMACK, C. J.; SAUNDERS, M. J. *et al.* Time of Day and Training Status Both Impact the Efficacy of Caffeine for Short Duration Cycling Performance. **Nutrients**, 8, n. 10, Oct 14 2016.

BRUCE, M.; SCOTT, N.; LADER, M.; MARKS, V. The psychopharmacological and electrophysiological effects of single doses of caffeine in healthy human subjects. **Br J Clin Pharmacol**, 22, n. 1, p. 81-87, Jul 1986.

BÜHLER, E.; LACHENMEIER, D. W.; SCHLEGEL, K. Development of a tool to assess the caffeine intake among teenagers and young adults. **Science & Research**, 1, n. 4, p. 6, 2014.

BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G.; CRINCOLI, C. M. Safety assessment of kola nut extract as a food ingredient. **Food Chem Toxicol**, 47, n. 8, p. 1725-1732, Aug 2009.

BURRAGE, E.; MARSHALL, K. L.; SANTANAM, N.; CHANTLER, P. D. Cerebrovascular dysfunction with stress and depression. **Brain Circ**, 4, n. 2, p. 43-53, Apr-Jun 2018.

CARSWELL, A. T.; HOWLAND, K.; MARTINEZ-GONZALEZ, B.; BARON, P. *et al.* The effect of caffeine on cognitive performance is influenced by CYP1A2 but not ADORA2A genotype, yet neither genotype affects exercise performance in healthy adults. **Eur J Appl Physiol**, 120, n. 7, p. 1495-1508, Jul 2020.

CARVALHO, A.; MARTICORENA, F. M.; GRECCO, B. H.; BARRETO, G. *et al.* Can I Have My Coffee and Drink It? A Systematic Review and Meta-analysis to Determine Whether Habitual Caffeine Consumption Affects the Ergogenic Effect of Caffeine. **Sports Med**, 52, n. 9, p. 2209-2220, Sep 2022.

CASTORENA-TORRES, F.; MENDOZA-CANTU, A.; DE LEON, M. B.; CISNEROS, B. *et al.* CYP1A2 phenotype and genotype in a population from the Carboniferous Region of Coahuila, Mexico. **Toxicol Lett**, 156, n. 3, p. 331-339, Apr 28 2005.

CHILDS, E.; HOHOFF, C.; DECKERT, J.; XU, K. *et al.* Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. **Neuropsychopharmacology**, 33, n. 12, p. 2791-2800, Nov 2008.

COLE, M.; COLEMAN, D.; HOPKER, J.; WILES, J. Improved gross efficiency during long duration submaximal cycling following a short-term high carbohydrate diet. **Int J Sports Med**, 35, n. 3, p. 265-269, Mar 2014.

CONDE, S. V.; OBESO, A.; VICARIO, I.; RIGUAL, R. *et al.* Caffeine inhibition of rat carotid body chemoreceptors is mediated by A2A and A2B adenosine receptors. **J Neurochem**, 98, n. 2, p. 616-628, Jul 2006.

CORREIA-OLIVEIRA, C.; LOPES-SILVA, J. P. Caffeine Combined With Sodium Bicarbonate Improves Pacing and Overall Performance During a High-Intensity Time Trial. **Res Q Exerc Sport**, 94, n. 2, p. 586-595, Jun 2023.

CORREIA-OLIVEIRA, C. R.; BERTUZZI, R.; DAL'MOLIN KISS, M. A.; LIMA-SILVA, A. E. Strategies of dietary carbohydrate manipulation and their effects on performance in cycling time trials. **Sports Med**, 43, n. 8, p. 707-719, Aug 2013.

COURTNEY S. KLEIN, A. C.,¹ Michael Martin,¹ Michael J. Saunders,¹ Judith A. Flohr,¹ Marta K. Bechtel,² Wade Dunham,² Melyssa Hancock,² and Christopher J. Womack¹. The Effect of Caffeine on Performance in Collegiate Tennis Players. **JOURNAL OF CAFFEINE RESEARCH**, 2, n. 3, p. 6, 2012.

CREESE, I.; SIBLEY, D. R. Receptor adaptations to centrally acting drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 21, p. 357-391, 1981.

DALY, J. W.; BUTTS-LAMB, P.; PADGETT, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. **Cell Mol Neurobiol**, 3, n. 1, p. 69-80, Mar 1983.

DAVENPORT, A. D.; JAMESON, T. S. O.; KILROE, S. P.; MONTEYNE, A. J. *et al.* A Randomised, Placebo-Controlled, Crossover Study Investigating the Optimal Timing of a Caffeine-Containing Supplement for Exercise Performance. **Sports Med Open**, 6, n. 1, p. 17, Mar 30 2020.

DAVIS, J. M.; ZHAO, Z.; STOCK, H. S.; MEHL, K. A. *et al.* Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 284, n. 2, p. R399-404, Feb 2003.

DE PAUW, K.; ROELANDS, B.; CHEUNG, S. S.; DE GEUS, B. *et al.* Guidelines to classify subject groups in sport-science research. **International journal of sports physiology and performance**, 8, n. 2, p. 111-122, 2013.

DE SOUZA, J. G.; DEL COSO, J.; FONSECA, F. S.; SILVA, B. V. C. *et al.* Risk or benefit? Side effects of caffeine supplementation in sport: a systematic review. **Eur J Nutr**, 61, n. 8, p. 3823-3834, Dec 2022.

DECROIX, L.; DE PAUW, K.; FOSTER, C.; MEEUSEN, R. Guidelines to classify female subject groups in sport-science research. **International journal of sports physiology and performance**, 11, n. 2, p. 204-213, 2016.

DJORDJEVIC, N.; GHOTBI, R.; JANKOVIC, S.; AKLILLU, E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption is associated with the CYP1A2 -163C>A polymorphism. **Eur J Clin Pharmacol**, 66, n. 7, p. 697-703, Jul 2010.

DODD, S. L.; HERB, R. A.; POWERS, S. K. Caffeine and exercise performance. An update. **Sports Med**, 15, n. 1, p. 14-23, Jan 1993.

DOERING, T. M.; FELL, J. W.; LEVERITT, M. D.; DESBROW, B. *et al.* The effect of a caffeinated mouth-rinse on endurance cycling time-trial performance. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, 24, n. 1, p. 90-97, Feb 2014.

DOHERTY, M.; SMITH, P. M. Effects of caffeine ingestion on rating of perceived exertion during and after exercise: a meta-analysis. **Scand J Med Sci Sports**, 15, n. 2, p. 69-78, Apr 2005.

EGBEWALE, B. E.; LEWIS, M.; SIM, J. Bias, precision and statistical power of analysis of covariance in the analysis of randomized trials with baseline imbalance: a simulation study. **BMC Med Res Methodol**, 14, p. 49, Apr 9 2014.

EL YACOUBI, M.; LEDENT, C.; MENARD, J. F.; PARMENTIER, M. *et al.* The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. **Br J Pharmacol**, 129, n. 7, p. 1465-1473, Apr 2000.

FELIPPE, L. C.; FERREIRA, G. A.; LEARSI, S. K.; BOARI, D. *et al.* Caffeine increases both total work performed above critical power and peripheral fatigue during a 4-km cycling time trial. **J Appl Physiol (1985)**, 124, n. 6, p. 1491-1501, Jun 1 2018.

FERREIRA VIANA, B.; TRAJANO, G. S.; UGRINOWITSCH, C.; OLIVEIRA PIRES, F. Caffeine increases motor output entropy and performance in 4 km cycling time trial. **PLoS One**, 15, n. 8, p. e0236592, 2020.

FOAD, A. J.; BEEDIE, C. J.; COLEMAN, D. A. Pharmacological and psychological effects of caffeine ingestion in 40-km cycling performance. **Med Sci Sports Exerc**, 40, n. 1, p. 158-165, Jan 2008.

FONTANA, R. J.; LOWN, K. S.; PAINE, M. F.; FORTLAGE, L. *et al.* Effects of a chargrilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. **Gastroenterology**, 117, n. 1, p. 89-98, Jul 1999.

FREDHOLM, B. B. Adenosine and metabolism—a brief historical note. *In: Adenosine*: Springer, 2013. p. 3-19.

FREDHOLM, B. B.; AP, I. J.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K. N. *et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**, 53, n. 4, p. 527-552, Dec 2001.

FREDHOLM, B. B.; BÄTTIG, K.; HOLMÉN, J.; NEHLIG, A. *et al.* Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological reviews**, 51, n. 1, p. 83-133, 1999.

FRIEDMAN, H. Simplified Determinations of Statistical Power, Magnitude of Effect and Research Sample Sizes. **Educational and Psychological Measurement**, 42, n. 2, p. 521-526, 1982.

GIERSCH, G. E.; BOYETT, J. C.; HARGENS, T. A.; LUDEN, N. D. *et al.* The Effect of the CYP1A2– 163 C> a polymorphism on caffeine metabolism and subsequent cycling performance. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**, 8, n. 2, p. 65-70, 2018.

GLAISTER, M.; CHOPRA, K.; DE SENA, A. L. P.; STERNBACH, C. *et al.* Caffeine, exercise physiology, and time-trial performance: no effect of ADORA2A or CYP1A2 genotypes. **APPLIED PHYSIOLOGY NUTRITION AND METABOLISM**, 46, n. 6, p. 541-551, JUN 2021.

GLAISTER, M.; GISSANE, C. Caffeine and Physiological Responses to Submaximal Exercise: A Meta-Analysis. **Int J Sports Physiol Perform**, 13, n. 4, p. 402-411, Apr 1 2018.

GLAISTER, M.; LYTHGOE, D.; KAMATH, S. The Effects of Caffeine on Heart Rate and Heart Rate Variability at Rest and During Submaximal Cycling Exercise. **Res Q Exerc Sport**, p. 1-9, Jul 15 2024.

GLAISTER, M.; MOIR, G. Effects of caffeine on time trial performance and associated physiological responses: A meta-analysis. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**, 9, n. 2, p. 40-52, 2019.

GONCALVES, L. S.; PAINELLI, V. S.; YAMAGUCHI, G.; OLIVEIRA, L. F. *et al.* Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. **J Appl Physiol (1985)**, 123, n. 1, p. 213-220, Jul 1 2017.

GRGIC, J. Caffeine ingestion enhances Wingate performance: a meta-analysis. **Eur J Sport Sci**, 18, n. 2, p. 219-225, Mar 2018.

GRGIC, J.; GRGIC, I.; PICKERING, C.; SCHOENFELD, B. J. *et al.* Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance-an umbrella review of 21 published meta-analyses. **Br J Sports Med**, Mar 29 2019.

GRGIC, J.; MIKULIC, P.; SCHOENFELD, B. J.; BISHOP, D. J. *et al.* The Influence of Caffeine Supplementation on Resistance Exercise: A Review. **Sports Med**, 49, n. 1, p. 17-30, Jan 2019.

GRGIC, J.; PICKERING, C.; BISHOP, D. J.; SCHOENFELD, B. J. *et al.* CYP1A2 genotype and acute effects of caffeine on resistance exercise, jumping, and sprinting performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, 17, n. 1, p. 1-11, 2020.

GRGIC, J.; PICKERING, C.; DEL COSO, J.; SCHOENFELD, B. J. *et al.* CYP1A2 genotype and acute ergogenic effects of caffeine intake on exercise performance: a systematic review. **Eur J Nutr**, 60, n. 3, p. 1181-1195, Apr 2021.

GRGIC, J.; TREXLER, E. T.; LAZINICA, B.; PEDISIC, Z. Effects of caffeine intake on muscle strength and power: a systematic review and meta-analysis. **J Int Soc Sports Nutr**, 15, p. 11, 2018.

GRGIC, J.; VAROVIC, D. Moderators of Caffeine's Effects on Jumping Performance in Females: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Am Nutr Assoc**, 43, n. 1, p. 92-100, Jan 2024.

GU, L.; GONZALEZ, F. J.; KALOW, W.; TANG, B. K. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. **Pharmacogenetics**, 2, n. 2, p. 73-77, Apr 1992.

GUEST, N.; COREY, P.; VESCOVI, J.; EL-SOHEMY, A. Caffeine, CYP1A2 Genotype, and Endurance Performance in Athletes. **Med Sci Sports Exerc**, 50, n. 8, p. 1570-1578, Aug 2018.

GUEST, N. S.; VANDUSSELDORP, T. A.; NELSON, M. T.; GRGIC, J. *et al.* International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance. **J Int Soc Sports Nutr**, 18, n. 1, p. 1, Jan 2021.

GUNES, A.; OZBEY, G.; VURAL, E. H.; ULUOGLU, C. *et al.* Influence of genetic polymorphisms, smoking, gender and age on CYP1A2 activity in a Turkish population. **Pharmacogenomics**, 10, n. 5, p. 769-778, May 2009.

GUNTORO AJI, Y.; MELITA, S.; DIJAYA, R.; SUBALI, D. *et al.* Evaluation of Caffeine Ingested Timing on Endurance Performance based on CYP1A2 rs762551 Profiling in Healthy Sedentary Young Adults. **Rep Biochem Mol Biol**, 11, n. 4, p. 663-671, Jan 2023.

HAFLIETHADOTTIR, S. H.; JUHL, C. B.; NIELSEN, S. M.; HENRIKSEN, M. *et al.* Placebo response and effect in randomized clinical trials: meta-research with focus on contextual effects. **Trials**, 22, n. 1, p. 493, Jul 26 2021.

HAN, X. M.; OUYANG, D. S.; CHEN, X. P.; SHU, Y. *et al.* Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. **Br J Clin Pharmacol**, 54, n. 5, p. 540-543, Nov 2002.

HAN, X. X.; BONEN, A. Epinephrine translocates GLUT-4 but inhibits insulin-stimulated glucose transport in rat muscle. **Am J Physiol**, 274, n. 4, p. E700-707, Apr 1998.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **J Food Sci**, 75, n. 3, p. R77-87, Apr 2010.

HESTERBERG, T. Bootstrap. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, 3, n. 6, p. 497-526, 2011.

HIBBERT, A. W.; BILLAUT, F.; VARLEY, M. C.; POLMAN, R. C. J. Familiarization Protocol Influences Reproducibility of 20-km Cycling Time-Trial Performance in Novice Participants. **Front Physiol**, 8, p. 488, 2017.

HILLI, J.; KORHONEN, T.; TURPEINEN, M.; HOKKANEN, J. *et al.* The effect of oral contraceptives on the pharmacokinetics of melatonin in healthy subjects with CYP1A2 g.-163C>A polymorphism. **J Clin Pharmacol**, 48, n. 8, p. 986-994, Aug 2008.

HORVATH, A.; KOTELES, F.; SZABO, A. Nocebo effects on motor performance: A systematic literature review. **Scand J Psychol**, 62, n. 5, p. 665-674, Oct 2021.

HUNTER, A. M.; ST CLAIR GIBSON, A.; COLLINS, M.; LAMBERT, M. *et al.* Caffeine ingestion does not alter performance during a 100-km cycling time-trial performance. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, 12, n. 4, p. 438-452, Dec 2002.

JACKSON, A. S.; POLLOCK, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. **Br J Nutr**, 40, n. 3, p. 497-504, Nov 1978.

JAGER, J.; PUTNICK, D. L.; BORNSTEIN, M. H. li. More Than Just Convenient: The Scientific Merits of Homogeneous Convenience Samples. **Monogr Soc Res Child Dev**, 82, n. 2, p. 13-30, Jun 2017.

JAMES, J. E.; CROSBIE, J.; PAULL, I. Symptomatology of habitual caffeine use amongst psychiatric patients. **Australian Journal of Psychology**, 39, n. 2, p. 139-149, 1987/08/01 1987.

JAMES, K. E.; BLOCH, D. A.; LEE, K. K.; KRAEMER, H. C. *et al.* An index for assessing blindness in a multi-centre clinical trial: disulfiram for alcohol cessation--a VA cooperative study. **Stat Med**, 15, n. 13, p. 1421-1434, Jul 15 1996.

JEUKENDRUP, A. E.; CRAIG, N. P.; HAWLEY, J. A. The bioenergetics of World Class Cycling. **J Sci Med Sport**, 3, n. 4, p. 414-433, Dec 2000.

KALINCHUK, A. V.; MCCARLEY, R. W.; PORKKA-HEISKANEN, T.; BASHEER, R. The time course of adenosine, nitric oxide (NO) and inducible NO synthase changes in the brain with sleep loss and their role in the non-rapid eye movement sleep homeostatic cascade. **J Neurochem**, 116, n. 2, p. 260-272, Jan 2011.

KAMIMORI, G. H.; KARYEKAR, C. S.; OTTERSTETTER, R.; COX, D. S. *et al.* The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. **Int J Pharm**, 234, n. 1-2, p. 159-167, Mar 2 2002.

KEISLER, B. D.; ARMSEY, T. D., 2nd. Caffeine as an ergogenic aid. **Curr Sports Med Rep**, 5, n. 4, p. 215-219, Jun 2006.

KOLAH, J.; BANG, H.; PARK, J. Towards a proposal for assessment of blinding success in clinical trials: up-to-date review. **Community Dent Oral Epidemiol**, 37, n. 6, p. 477-484, Dec 2009.

KOONRUNGSESOMBOON, N.; KHATSRI, R.; WONGCHOMPOO, P.; TEEKACHUNHATEAN, S. The impact of genetic polymorphisms on CYP1A2 activity in humans: a systematic review and meta-analysis. **Pharmacogenomics J**, 18, n. 6, p. 760-768, Dec 2018.

LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Front Psychol**, 4, p. 863, Nov 26 2013.

LANE, J. D.; STEEGE, J. F.; RUPP, S. L.; KUHN, C. M. Menstrual cycle effects on caffeine elimination in the human female. **Eur J Clin Pharmacol**, 43, n. 5, p. 543-546, 1992.

LARA, B.; RUIZ-MORENO, C.; SALINERO, J. J.; DEL COSO, J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. **PLoS One**, 14, n. 1, p. e0210275, 2019.

LAU, C. E.; FALK, J. L. Dose-dependent surmountability of locomotor activity in caffeine tolerance. **Pharmacol Biochem Behav**, 52, n. 1, p. 139-143, Sep 1995.

LAZARUS, M.; OISHI, Y.; BJORNESS, T. E.; GREENE, R. W. Gating and the Need for Sleep: Dissociable Effects of Adenosine A1 and A2A Receptors. **Front Neurosci**, 13, p. 740, 2019.

LIANG, H. C.; LI, H.; MCKINNON, R. A.; DUFFY, J. J. *et al.* Cyp1a2(-/-) null mutant mice develop normally but show deficient drug metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 4, p. 1671-1676, Feb 20 1996.

LIN, Y. S.; WEIBEL, J.; LANDOLT, H. P.; SANTINI, F. *et al.* Brain activity during a working memory task after daily caffeine intake and caffeine withdrawal: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Sci Rep**, 13, n. 1, p. 1002, Jan 18 2023.

LISZT, K. I.; LEY, J. P.; LIEDER, B.; BEHRENS, M. *et al.* Caffeine induces gastric acid secretion via bitter taste signaling in gastric parietal cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 30, p. E6260-E6269, Jul 25 2017.

MAGKOS, F.; KAVOURAS, S. A. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 45, n. 7-8, p. 535-562, 2005.

MAI-LIPPOLD, S. A.; DETTLINGER, C. M.; KHALSA, S. S.; POLLATOS, O. A pilot study on the effect of an energy drink on interoception in high vs. low anxiety sensitivity individuals. **European Journal of Health Psychology**, 2021.

MARQUES, A. C.; JESUS, A. A.; GIGLIO, B. M.; MARINI, A. C. *et al.* Acute Caffeinated Coffee Consumption Does not Improve Time Trial Performance in an 800-m Run: A Randomized, Double-Blind, Crossover, Placebo-Controlled Study. **Nutrients**, 10, n. 6, May 23 2018.

MARTICORENA, F. M.; CARVALHO, A.; OLIVEIRA, L. F.; DOLAN, E. *et al.* Nonplacebo Controls to Determine the Magnitude of Ergogenic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. **Med Sci Sports Exerc**, 53, n. 8, p. 1766-1777, Aug 1 2021.

MAUGHAN, R. J.; BURKE, L. M.; DVORAK, J.; LARSON-MEYER, D. E. *et al.* IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. **Br J Sports Med**, 52, n. 7, p. 439-455, Apr 2018.

MCCALL, A. L.; MILLINGTON, W. R.; WURTMAN, R. J. Blood-brain barrier transport of caffeine: dose-related restriction of adenine transport. **Life Sci**, 31, n. 24, p. 2709-2715, Dec 13 1982.

MCGRATH, M. C. **The significance of CYP1A2 genotype on caffeine metabolism and exercise performance: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in Human Nutrition at Massey University, Manawatu, New Zealand.** 2015. -, Massey University.

MEISSNER, K. Placebo, nocebo: Believing in the field of medicine. **Front Pain Res (Lausanne)**, 3, p. 972169, 2022.

MIDGLEY, A. W.; MARCHANT, D. C.; LEVY, A. R. A call to action towards an evidence-based approach to using verbal encouragement during maximal exercise testing. **Clin Physiol Funct Imaging**, 38, n. 4, p. 547-553, Jul 2018.

MIRIZIO, G. G.; NUNES, R. S. M.; VARGAS, D. A.; FOSTER, C. *et al.* Time-of-Day Effects on Short-Duration Maximal Exercise Performance. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 9485, Jun 11 2020.

MORA-RODRIGUEZ, R.; PALLARES, J. G.; LOPEZ-GULLON, J. M.; LOPEZ-SAMANES, A. *et al.* Improvements on neuromuscular performance with caffeine ingestion depend on the time-of-day. **J Sci Med Sport**, 18, n. 3, p. 338-342, May 2015.

MUNOZ, A.; AGUILAR-NAVARRO, M.; RUIZ-MORENO, C.; VARILLAS-DELGADO, D. *et al.* Influence of the time of day in the effect of caffeine on maximal fat oxidation during exercise in women: a randomized, crossover, double-blind, and placebo-controlled study. **Eur J Appl Physiol**, Sep 20 2023.

MUNOZ, A.; AGUILAR-NAVARRO, M.; RUIZ-MORENO, C.; VARILLAS-DELGADO, D. *et al.* Influence of the time of day in the effect of caffeine on maximal fat oxidation during exercise in women: a randomized, crossover, double-blind, and placebo-controlled study. **Eur J Appl Physiol**, 124, n. 3, p. 849-859, Mar 2024.

MUNOZ, A.; LOPEZ-SAMANES, A.; AGUILAR-NAVARRO, M.; VARILLAS-DELGADO, D. *et al.* Effects of CYP1A2 and ADORA2A Genotypes on the Ergogenic Response to Caffeine in Professional Handball Players. **Genes (Basel)**, 11, n. 8, Aug 13 2020.

NEHLIG, A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. **Pharmacol Rev**, 70, n. 2, p. 384-411, Apr 2018.

NEHLIG, A. Effects of Coffee on the Gastro-Intestinal Tract: A Narrative Review and Literature Update. **Nutrients**, 14, n. 2, Jan 17 2022.

OU-YANG, D. S.; HUANG, S. L.; WANG, W.; XIE, H. G. *et al.* Phenotypic polymorphism and gender-related differences of CYP1A2 activity in a Chinese population. **Br J Clin Pharmacol**, 49, n. 2, p. 145-151, Feb 2000.

PARK, J.; GUPTA, R. S. Adenosine metabolism, adenosine kinase, and evolution. *In: Adenosine*: Springer, 2013. p. 23-54.

PARROTTA, E.; BACH, P.; PERRUCCI, M. G.; COSTANTINI, M. *et al.* Heart is deceitful above all things: Threat expectancy induces the illusory perception of increased heartrate. **Cognition**, 245, p. 105719, Apr 2024.

PATAKY, M. W.; WOMACK, C. J.; SAUNDERS, M. J.; GOFFE, J. L. *et al.* Caffeine and 3-km cycling performance: Effects of mouth rinsing, genotype, and time of day. **Scand J Med Sci Sports**, 26, n. 6, p. 613-619, Jun 2016.

PERERA, V.; GROSS, A. S.; MCLACHLAN, A. J. Measurement of CYP1A2 activity: a focus on caffeine as a probe. **Curr Drug Metab**, 13, n. 5, p. 667-678, Jun 1 2012.

PETERSON, S.; SCHWARZ, Y.; LI, S. S.; LI, L. *et al.* CYP1A2, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and diet effects on CYP1A2 activity in a crossover feeding trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 18, n. 11, p. 3118-3125, Nov 2009.

PICKERING, C.; KIELY, J. Are the Current Guidelines on Caffeine Use in Sport Optimal for Everyone? Inter-individual Variation in Caffeine Ergogenicity, and a Move Towards Personalised Sports Nutrition. **Sports Med**, 48, n. 1, p. 7-16, Jan 2018.

PORKKA-HEISKANEN, T. Methylxanthines and sleep. *In: Methylxanthines*: Springer, 2011. p. 331-348.

POTGIETER, S. **The effect of caffeine supplementation on Olympic-distance triathletes and triathlon performance in the Western Cape, South Africa.** 2013. -, Stellenbosch: Stellenbosch University.

PUENTE, C.; ABIAN-VICEN, J.; DEL COSO, J.; LARA, B. *et al.* The CYP1A2 -163C>A polymorphism does not alter the effects of caffeine on basketball performance. **PLoS One**, 13, n. 4, p. e0195943, 2018.

PUTH, M. T.; NEUHAUSER, M.; RUXTON, G. D. On the variety of methods for calculating confidence intervals by bootstrapping. **J Anim Ecol**, 84, n. 4, p. 892-897, Jul 2015.

QIAN, Y.; GURLEY, B. J.; MARKOWITZ, J. S. The Potential for Pharmacokinetic Interactions Between Cannabis Products and Conventional Medications. **J Clin Psychopharmacol**, 39, n. 5, p. 462-471, Sep/Oct 2019.

RAGLIN, J.; SZABO, A.; LINDHEIMER, J. B.; BEEDIE, C. Understanding placebo and nocebo effects in the context of sport: A psychological perspective. **Eur J Sport Sci**, 20, n. 3, p. 293-301, Apr 2020.

RAHIMI, R. The effect of CYP1A2 genotype on the ergogenic properties of caffeine during resistance exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. **Ir J Med Sci**, 188, n. 1, p. 337-345, Feb 2019.

RAPOPORT, J. L.; JENSVOLD, M.; ELKINS, R.; BUCHSBAUM, M. S. *et al.* Behavioral and cognitive effects of caffeine in boys and adult males. **J Nerv Ment Dis**, 169, n. 11, p. 726-732, Nov 1981.

REIS, C. E. G.; SAUNDERS, B.; DA COSTA, T. H. M. Absence of dietary control precludes solid conclusions for sport nutrition trials. **J Sci Med Sport**, 24, n. 6, p. 518-519, Jun 2021.

RIKSEN, N. P.; SMITS, P.; RONGEN, G. A. The cardiovascular effects of methylxanthines. **Handb Exp Pharmacol**, n. 200, p. 413-437, 2011.

RILEY, R. D.; LAMBERT, P. C.; ABO-ZAID, G. Meta-analysis of individual participant data: rationale, conduct, and reporting. **BMJ**, 340, p. c221, Feb 5 2010.

ROBERTSON, C. M.; PULLINGER, S. A.; ROBINSON, W. R.; SMITH, M. E. *et al.* Circadian variation in muscle force output in males using isokinetic, isometric dynamometry: can we observe this in multi-joint movements using the muscleLab force-velocity encoder and are they similar in peak and magnitude? **Chronobiol Int**, p. 1-16, May 9 2024.

ROCHA, P. L. A.; LIMA, A. L. C.; SAUNDERS, B.; REIS, C. E. G. Development of a Caffeine Content Table for Foods, Drinks, Medications and Supplements Typically Consumed by the Brazilian Population. **Nutrients**, 14, n. 20, Oct 21 2022.

RODAK, K.; KOKOT, I.; KRATZ, E. M. Caffeine as a Factor Influencing the Functioning of the Human Body-Friend or Foe? **Nutrients**, 13, n. 9, Sep 2 2021.

ROYSTON, P.; SAUERBREI, W. Bootstrap assessment of the stability of multivariable models. **The Stata Journal**, 9, n. 4, p. 547-570, 2009.

SACHSE, C.; BROCKMOLLER, J.; BAUER, S.; ROOTS, I. Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. **Br J Clin Pharmacol**, 47, n. 4, p. 445-449, Apr 1999.

SACRAMENTO, J. F.; RIBEIRO, M. J.; YUBERO, S.; MELO, B. F. *et al.* Disclosing caffeine action on insulin sensitivity: effects on rat skeletal muscle. **Eur J Pharm Sci**, 70, p. 107-116, Apr 5 2015.

SALAMONE, J. D.; CORREA, M.; RANDALL, P. A.; NUNES, E. J. *et al.* The role of adenosine in the ventral striatal circuits regulating behavioral activation and effort-related decision making: importance for normal and pathological aspects of motivation. *In: Adenosine*: Springer, 2013. p. 493-512.

SALINERO, J. J.; LARA, B.; DEL COSO, J. Effects of acute ingestion of caffeine on team sports performance: a systematic review and meta-analysis. **Res Sports Med**, 27, n. 2, p. 238-256, Apr-Jun 2019.

SALINERO, J. J.; LARA, B.; RUIZ-VICENTE, D.; ARECES, F. *et al.* CYP1A2 Genotype Variations Do Not Modify the Benefits and Drawbacks of Caffeine during Exercise: A Pilot Study. **Nutrients**, 9, n. 3, Mar 11 2017.

SANTOS, P. S.; FELIPPE, L. C.; FERREIRA, G. A.; LEARSI, S. K. *et al.* Caffeine increases peripheral fatigue in low- but not in high-performing cyclists. **Appl Physiol Nutr Metab**, 45, n. 11, p. 1208-1215, Nov 2020.

SANTOS RDE, A.; KISS, M. A.; SILVA-CAVALCANTE, M. D.; CORREIA-OLIVEIRA, C. R. *et al.* Caffeine alters anaerobic distribution and pacing during a 4000-m cycling time trial. **PLoS One**, 8, n. 9, p. e75399, 2013.

SAUNDERS, B.; DE OLIVEIRA, L. F.; DA SILVA, R. P.; DE SALLES PAINELLI, V. *et al.* Placebo in sports nutrition: a proof-of-principle study involving caffeine supplementation. **Scand J Med Sci Sports**, 27, n. 11, p. 1240-1247, Nov 2017.

SAUNDERS, B.; DE OLIVEIRA, L. F.; DA SILVA, R. P.; DE SALLES PAINELLI, V. *et al.* Caffeine supplementation improves simulated 16 km cycling time-trial performance without altering pacing strategy. **Journal of Science and Cycling**, 5, n. 2, 2016.

SAWILOWSKY, S. S. New Effect Size Rules of Thumb. **Journal of Modern Applied Statistical Methods**, 8, n. 2, p. 597-599, 2009.

SAWYNOK, J. Adenosine and pain. *In: Adenosine*: Springer, 2013. p. 343-360.

SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONCALVES, J. F.; MAZZAFERA, P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **J Ethnopharmacol**, 150, n. 1, p. 14-31, Oct 28 2013.

SCHOMAKER, M.; HEUMANN, C. Bootstrap inference when using multiple imputation. **Stat Med**, 37, n. 14, p. 2252-2266, Jun 30 2018.

SHIM, J. S.; OH, K.; KIM, H. C. Dietary assessment methods in epidemiologic studies. **Epidemiol Health**, 36, p. e2014009, 2014.

SHRYOCK, J. C.; BELARDINELLI, L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. **Am J Cardiol**, 79, n. 12A, p. 2-10, Jun 19 1997.

SICOVA, M. **Genetic Modifiers of Caffeine and Maximal Exercise in Male Athletes**. 2021. -, University of Toronto (Canada).

SICOVA, M.; GUEST, N. S.; TYRRELL, P. N.; EL-SOHEMY, A. Caffeine, genetic variation and anaerobic performance in male athletes: a randomized controlled trial. **Eur J Appl Physiol**, 121, n. 12, p. 3499-3513, Dec 2021.

SILVA-CAVALCANTE, M. D.; CORREIA-OLIVEIRA, C. R.; SANTOS, R. A.; LOPES-SILVA, J. P. *et al.* Caffeine increases anaerobic work and restores cycling performance following a protocol designed to lower endogenous carbohydrate availability. **PLoS One**, 8, n. 8, p. e72025, 2013.

SIMON, T.; BECQUEMONT, L.; HAMON, B.; NOUYRIGAT, E. *et al.* Variability of cytochrome P450 1A2 activity over time in young and elderly healthy volunteers. **Br J Clin Pharmacol**, 52, n. 5, p. 601-604, Nov 2001.

SKINNER, T. L.; JENKINS, D. G.; COOMBES, J. S.; TAAFFE, D. R. *et al.* Dose response of caffeine on 2000-m rowing performance. **Med Sci Sports Exerc**, 42, n. 3, p. 571-576, Mar 2010.

SMITH, B. D.; RAFFERTY, J.; LINDGREN, K.; SMITH, D. A. *et al.* Effects of habitual caffeine use and acute ingestion: testing a biobehavioral model. **Physiol Behav**, 51, n. 1, p. 131-137, Jan 1992.

SOARES, R. N.; SCHNEIDER, A.; VALLE, S. C.; SCHENKEL, P. C. The influence of CYP1A2 genotype in the blood pressure response to caffeine ingestion is affected by physical activity status and caffeine consumption level. **Vascul Pharmacol**, 106, p. 67-73, Jul 2018.

SOKMEN, B.; ARMSTRONG, L. E.; KRAEMER, W. J.; CASA, D. J. *et al.* Caffeine use in sports: considerations for the athlete. **J Strength Cond Res**, 22, n. 3, p. 978-986, May 2008.

SOUISSI, Y.; SOUISSI, M.; CHTOUROU, H. Effects of caffeine ingestion on the diurnal variation of cognitive and repeated high-intensity performances. **Pharmacol Biochem Behav**, 177, p. 69-74, Feb 2019.

SOUTHWARD, K.; RUTHERFURD-MARKWICK, K.; BADENHORST, C.; ALI, A. The role of genetics in moderating the inter-individual differences in the ergogenicity of caffeine. **Nutrients**, 10, n. 10, p. 1352, 2018.

SOUTHWARD, K.; RUTHERFURD-MARKWICK, K. J.; ALI, A. The Effect of Acute Caffeine Ingestion on Endurance Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Med**, 48, n. 8, p. 1913-1928, Aug 2018.

SPINELI, H.; PINTO, M. P.; DOS SANTOS, B. P.; LIMA-SILVA, A. E. *et al.* Caffeine improves various aspects of athletic performance in adolescents independent of their 163 C>A CYP1A2 genotypes. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, 30, n. 10, p. 1869-1877, 2020. Article.

STOJANOVIC, E.; SCANLAN, A. T.; MILANOVIC, Z.; FOX, J. L. *et al.* Acute caffeine supplementation improves jumping, sprinting, and change-of-direction performance in basketball players when ingested in the morning but not evening. **Eur J Sport Sci**, 22, n. 3, p. 360-370, Mar 2022.

SWART, J.; LAMBERTS, R. P.; LAMBERT, M. I.; LAMBERT, E. V. *et al.* Exercising with reserve: exercise regulation by perceived exertion in relation to duration of exercise and knowledge of endpoint. **Br J Sports Med**, 43, n. 10, p. 775-781, Oct 2009.

TARNOPOLSKY, M. A. Caffeine and endurance performance. **Sports Med**, 18, n. 2, p. 109-125, Aug 1994.

TAYLOR, J. L.; CURRY, T. B.; MATZEK, L. J.; JOYNER, M. J. *et al.* Acute effects of a mixed meal on arterial stiffness and central hemodynamics in healthy adults. **Am J Hypertens**, 27, n. 3, p. 331-337, Mar 2014.

TEMPLE, J. L.; BERNARD, C.; LIPSHULTZ, S. E.; CZACHOR, J. D. *et al.* The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. **Front Psychiatry**, 8, p. 80, 2017.

TOMAZINI, F.; SANTOS-MARIANO, A.; ANDRADE-SOUZA, V. A.; SEBBEN, V. C. *et al.* Caffeine but not acetaminophen increases 4-km cycling time-trial performance. **PharmaNutrition**, 12, p. 100181, 2020.

TOMAZINI, F.; SANTOS-MARIANO, A. C.; DOS, S. A. V. F.; COELHO, D. B. *et al.* Caffeine ingestion increases endurance performance of trained male cyclists when riding against a virtual opponent without altering muscle fatigue. **Eur J Appl Physiol**, 122, n. 8, p. 1915-1928, Aug 2022.

VAN DEVENTER, G.; KAMEMOTO, E.; KUZNICKI, J. T.; HECKERT, D. C. *et al.* Lower esophageal sphincter pressure, acid secretion, and blood gastrin after coffee consumption. **Dig Dis Sci**, 37, n. 4, p. 558-569, Apr 1992.

WALTON, C.; KALMAR, J. M.; CAFARELLI, E. Effect of caffeine on self-sustained firing in human motor units. **J Physiol**, 545, n. 2, p. 671-679, Dec 1 2002.

WILES, J. D.; COLEMAN, D.; TEGERDINE, M.; SWAINE, I. L. The effects of caffeine ingestion on performance time, speed and power during a laboratory-based 1 km cycling time-trial. **J Sports Sci**, 24, n. 11, p. 1165-1171, Nov 2006.

WOMACK, C. J.; SAUNDERS, M. J.; BECHTEL, M. K.; BOLTON, D. J. *et al.* The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine. **J Int Soc Sports Nutr**, 9, n. 1, p. 7, Mar 15 2012.

WONG, O.; MARSHALL, K.; SICOVA, M.; GUEST, N. S. *et al.* CYP1A2 genotype modifies the effects of caffeine compared with placebo on muscle strength in competitive male athletes. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, 31, n. 5, p. 420-426, 2021. Article.

WU, W. C.; LIEN, S. H.; CHANG, J. H.; YANG, S. C. Caffeine alters resting-state functional connectivity measured by blood oxygenation level-dependent MRI. **NMR Biomed**, 27, n. 4, p. 444-452, Apr 2014.

XIAO, J.; HUANG, W. H.; PENG, J. B.; TAN, Z. R. *et al.* Quercetin significantly inhibits the metabolism of caffeine, a substrate of cytochrome P450 1A2 unrelated to CYP1A2*1C (-2964G>A) and *1F (734C>A) gene polymorphisms. **Biomed Res Int**, 2014, p. 405071, 2014.

YOO, C.; XING, D.; GONZALEZ, D. E.; JENKINS, V. *et al.* Paraxanthine provides greater improvement in cognitive function than caffeine after performing a 10-km run. **J Int Soc Sports Nutr**, 21, n. 1, p. 2352779, Dec 2024.

YOSHIHARA, T.; ZAITSU, M.; SHIRAISHI, F.; ARIMA, H. *et al.* Influence of genetic polymorphisms and habitual caffeine intake on the changes in blood pressure, pulse rate, and calculation speed after caffeine intake: A prospective, double blind, randomized trial in healthy volunteers. **J Pharmacol Sci**, 139, n. 3, p. 209-214, Mar 2019.

ZHANG, S.; PAUL, J.; NANTHA-AREE, M.; BUCKLEY, N. *et al.* Empirical comparison of four baseline covariate adjustment methods in analysis of continuous outcomes in randomized controlled trials. **Clin Epidemiol**, 6, p. 227-235, 2014.

ZHENG, X.; HASEGAWA, H. Administration of caffeine inhibited adenosine receptor agonist-induced decreases in motor performance, thermoregulation, and brain neurotransmitter release in exercising rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 140, p. 82-89, Jan 2016.

ZHOU, S. F.; YANG, L. P.; ZHOU, Z. W.; LIU, Y. H. *et al.* Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. **AAPS J**, 11, n. 3, p. 481-494, Sep 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 – Tabela de percepção subjetiva de esforço de Borg.

ESCALA DE PERCEPÇÃO DE ESFORÇO

6	7	MUITO FÁCIL
8	9	FÁCIL
10	11	RELATIVAMENTE FÁCIL
12	13	RELATIVAMENTE CANSATIVO
14	15	CANSATIVO
16	17	MUITO CANSATIVO
18	19	EXAUSTIVO
20		

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Poster de divulgação para recrutamento de participantes do Estudo A.

APÊNDICE 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.

APÊNDICE 3 – Questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

APÊNDICE 4 – Questionário de sintomas habituais ao consumo de cafeína.

APÊNDICE 5 – Modelo de recordatório alimentar aplicado aos participantes.

APÊNDICE 6 – Questionário de sintomas aplicado aos participantes do Estudo A.

APÊNDICE 7 – Poster de divulgação para recrutamento de participantes do Estudo B.

APÊNDICE 8 – Tabela contendo a concentração de cafeína utilizada para os cálculos

APÊNDICE 9 – Questionário de sintomas agudos para o Estudo B.

APÊNDICE 10 – Questionário de cegamento para o Estudo B.

APÊNDICE 11 – Poster contendo imagens de medidas caseiras e porções utilizado para a realização do questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

APÊNDICE 1 – Posteres de divulgação para recrutamento de participantes do Estudo A.

Estudo A



APÊNDICE 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE
 Comitê de Ética em Pesquisa

Formulário E

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. DADOS DO INDIVÍDUO

Nome completo _____
 RG _____
 CPF: _____
 Data de nascimento _____
 Endereço completo _____
 CEP _____
 Fone _____
 E-mail _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do Projeto de Pesquisa

Efeito do genótipo e consumo habitual de cafeína nas respostas individuais a suplementação aguda de cafeína

2. Pesquisador Responsável

Bruno Gualano.

3. Cargo/Função

Professor da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

4. Avaliação do risco da pesquisa:

RISCO MÍNIMO RISCO BAIXO RISCO MÉDIO RISCO MAIOR |
 (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

5. Duração da Pesquisa

8 semanas

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO INDIVÍDUO OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, DE FORMA CLARA E SIMPLES, CONSIGNANDO:

- Esta pesquisa pretende investigar: 1) os efeitos do polimorfismo no gene da enzima CYP1A2 (diferenças nos genes que controlam o metabolismo da cafeína) e do consumo habitual de cafeína nas respostas sanguíneas e de performance esportiva à suplementação aguda deste substrato em diferentes dosagens; e 2) a influência do polimorfismo no gene da enzima ADORA2A (diferenças nos genes que controlam a resposta psicológica à cafeína) no consumo habitual de cafeína em indivíduos saudáveis.
- Sua participação no estudo terá a duração de 8 semanas com 8 visitas ao laboratório. Na primeira visita, você realizará coleta de sangue através de uma punção na veia antecubital para posterior determinação do seu genótipo. Esse procedimento será conduzido por um profissional treinado

APÊNDICE 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE
 Comitê de Ética em Pesquisa

Formulário E

neste procedimento (Dr Luiz Riani ou Dr Bryan Sanders). Você também fará um teste incremental no cicloergômetro para determinarmos sua capacidade aeróbia um teste de ciclismo em que a carga (dificuldade) do teste será crescente, até que você não consiga mais manter o exercício. Amostras de sangue serão coletadas da ponta do dedo a cada 4 minutos para determinação dos limiares de lactato. O médico (Dr Luiz Riani) estará presente durante o teste incremental. Finalmente, você também fará uma familiarização do teste de ciclismo, um contrarelógio de 4 km. Na segunda visita, fará mais uma sessão de familiarização e coleta de sangue para avaliarmos as respostas à suplementação de cafeína no seu metabolismo. Na terceira visita, fará sua terceira e última sessão de familiarização ao teste. Nas próximas cinco visitas, você fará contrarelógio de 4 km em várias condições diferentes: 1) Controle (sem suplemento), 2) Placebo, 3) 3 mg·kg peso de cafeína, 4) 6 mg·kg peso de cafeína, 5) Placebo aberto (onde você será informado abertamente que receberá uma substância inerte, ou seja, placebo).

3. Antes, durante e após o teste de desempenho, serão coletados pequenas amostras de sangue da ponta de seu dedo para medirmos lactato e outros dados que nos dizem como está seu metabolismo (gasometria sanguínea). Além disso, você preencherá diários alimentares para que possamos avaliar seu consumo alimentar. Por fim, você também preencherá um questionário sobre sua experiência como ciclista para que possamos avaliar seu nível. Todas as visitas terão lugar no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada e Nutrição na Escola de Educação Física e Esporte - USP. Todos os testes serão realizados sob a supervisão de um fisiologista treinado (Dr. Bryan Saunders), enquanto um médico (Dr. Luiz Riani) permanecerá de prontidão nas instalações da Unidade, em caso de alguma emergência médica.
4. Os testes físicos poderão levá-lo a um grande cansaço físico, já que serão de alta intensidade. No caso de alguma intercorrência grave, os pesquisadores estão treinados a prestar primeiros socorros e os laboratórios estão equipados com os principais instrumentos em caso de emergência. O médico da unidade poderá atendê-lo toda vez que necessário. Havendo necessidade, você poderá ser encaminhado para o HU-USP (Hospital Universitário da USP) ou HC-FMUSP (Hospital das Clínicas). A punção do dedo pode trazer um desconforto moderado devido à picada da agulha. A punção da veia pode trazer um desconforto no braço devido ao aperto pelo garrote e à picada da agulha. Além disso, em alguns casos poderá ocorrer um hematoma (mancha roxa) em seu braço. No entanto, apenas uma punção por sessão ocorrerá para inserir uma cânula na veia; posteriormente, todas as coletas de sangue serão retiradas desta cânula. Esta punção na veia será realizada em 7 sessões; na segunda sessão serão coletadas até 9 seringas de 4 ml, que equivale a aproximadamente 36 ml. Nos testes principais serão coletadas 3 seringas de 4 ml (total: 12 ml).
5. Ao participar como voluntário desta pesquisa, você terá acesso a avaliações padrão-ouro do seu estado de saúde e condicionamento físico. Além disso, você terá direito a consultas nutricionais, onde você receberá aconselhamento profissional sobre como pode melhorar seus hábitos alimentares. Você poderá tirar todas as dúvidas que tiver sobre alimentação.
6. Caso você tenha interesse, você também poderá receber aconselhamento de profissionais de educação física sobre como realizar exercícios físicos adequadamente.

APÊNDICE 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE
 Comitê de Ética em Pesquisa

Formulário E

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas;
2. Você terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, e ainda assim terá acesso aos resultados de todas as avaliações realizadas;
3. Todos os seus dados serão mantidos sob confidencialidade, sigilo e privacidade. Eles poderão ser utilizados para publicações científicas, mas sua identidade nunca será revelada;
4. Estará a sua disponibilidade assistência no HU ou no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Bryan Saunders – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 2648-1337

Bruno Gualano – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 2648-1337

Comitê de Ética em Pesquisa da EEFPE-USP – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 3091-3097

Hospital Universitário da USP – Av. Prof. Lineu Prestes, 2565. Butantã Tel:(11) 3091-9200

VI. - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

São Paulo, ____ / ____ / ____

 assinatura do sujeito da pesquisa
 ou responsável legal

 assinatura do pesquisador
 (carimbo ou nome legível)

APÊNDICE 3 – Questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

Nº do questionário: _____

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Data de entrevista: ___/___/___ Hora de início: _____
 Nome do entrevistador: _____
 Nome/número do voluntário: _____ Sexo: ()M ()F
 Idade atual: _____ Data de nascimento: ___/___/___

1. Você mudou seus hábitos de consumo de cafeína recentemente ou está fazendo suplementação de cafeína para o desempenho ou por qualquer outro motivo?

- (1) Não (5) Sim, por outro motivo: _____
 (2) Sim, para melhorar o desempenho _____
 (3) Sim, para emagrecimento _____
 (4) Sim, para me manter alerta _____

2. Você está tomando algo para suplementar sua dieta (vitaminas, minerais e outros produtos)?

- (1) Não (2) Sim, regularmente (3) Sim, mas não regularmente

3. Se a resposta da pergunta for sim, responda:

Suplemento	Marca comercial	Dose	Frequência

APÊNDICE 3 – Questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

4. As questões seguintes relacionam-se ao seu hábito de consumo de cafeína no **PERÍODO DE UM ANO**. Para cada quadro responda, por favor, a frequência que melhor descreva **QUANTAS VEZES** você costuma consumir cada item e a respectiva **UNIDADE DE TEMPO** (se por dia, por semana, por mês ou ano).

Depois responda qual a sua **PORÇÃO INDIVIDUAL USUAL**. **ESCOLHA SOMENTE UM CÍRCULO PARA CADA COLUNA**.

Os exemplos dados são sugestões e você pode consumir todos os itens indicados. Se você não consome ou raramente consome um determinado item, preencha o círculo da primeira coluna (N=nunca consome). Não deixe itens em branco!

GRUPOS	MARCAS	Com que frequência você costuma consumir?				Qual o tamanho da sua porção?	
		QUANTAS VEZES VOCÊ COME: (N=nunca ou raramente comeu no último ano)	UNIDADE				
	Ex.: Starbucks, Pilão, Nescafé, Nespresso, etc.	Número de vezes: 1,2,3, etc. (N=nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano				Tamanho da sua porção. Ex.: 1 xícara peq., 1 duplo, 1 copo americano, etc.
CAFÉS		QUANTAS VEZES VOCÊ CONSOME	D	S	M	A	
Espresso		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Cappuccino		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Frappuccino		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
De coador		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Instantâneo		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
French Press		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Aeropress		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Ítalino (Moka)		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	

APÊNDICE 3 – Questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

		Com que frequência você costuma consumir?				Qual o tamanho da sua porção?	
<u>GRUPOS</u>	<u>MARCAS</u>	<u>QUANTAS VEZES VOCÊ COME:</u>	<u>UNIDADE</u>				
	Ex.: sem marca (granel), Leão, Twinings, Yamamotoyama, etc.	Número de vezes: 1,2,3, etc. (N=nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano				Tamanho da sua porção. Ex.: 1 xícara de chá, 1 copo americano, 1 caneca média, etc.
<u>CHÁS E OUTRAS BEBIDAS</u>		<u>QUANTAS VEZES VOCÊ CONSOME</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	
Chá verde		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Chá preto		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Chá mate /chimarrão		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Chá gelado (Ice Tea)		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Achocolatado		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	

		Com que frequência você costuma consumir?				Qual o tamanho da sua porção?	
<u>GRUPOS</u>	<u>OBSERVAÇÃO</u>	<u>QUANTAS VEZES VOCÊ COME:</u>	<u>UNIDADE</u>				
	Ex.: Sugar Free, etc.	Número de vezes: 1,2,3, etc. (N=nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano				Tamanho da sua porção. Ex.: 1 lata 290ml, 2 latas 250ml, 1 lata 473ml, etc.
<u>ENERGÉTICOS</u>		<u>QUANTAS VEZES VOCÊ CONSOME</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	
RedBull		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Monster		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
TNT		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Flash Power		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Life Booster		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Fusion		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	

APÊNDICE 3 – Questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

Burn		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Dopamina		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	

		Com que frequência você costuma consumir?				Qual o tamanho da sua porção?	
<u>GRUPOS</u>	<u>MARCAS</u>	QUANTAS VEZES VOCÊ COME:	UNIDADE				
		Número de vezes: 1,2,3, etc. (N=nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano				Tamanho da sua porção. Ex.: 1 tablete 30g, 2 col. de sopa, etc.
<u>ALIMENTOS</u>		QUANTAS VEZES VOCÊ CONSOME	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	
Chocolate ao leite		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Chocolate meio amargo (50%)		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Chocolate amargo (>50%)		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Cacau em pó		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	

APÊNDICE 3 – Questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

		Com que frequência você costuma consumir?				Qual o tamanho da sua porção?	
<u>GRUPOS</u>	MARCAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME:	UNIDADE				
	Ex.: Integral Médica, Probiótica, Athletica, etc.	Número de vezes: 1,2,3, etc. (N=nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano				Tamanho da sua porção. Ex.: 1 cápsula 210mg, 1 cápsula 400mg, 2 cápsulas 180mg, etc.
<u>SUPLEMENTOS</u>		QUANTAS VEZES VOCÊ CONSOME	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	
Cafeína		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Pré-treino		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Gel de carboidrato com cafeína		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	

		Com que frequência você costuma consumir?				Qual o tamanho da sua porção?	
<u>GRUPOS</u>	NOMES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME:	UNIDADE				
	Ex.: Neosaldina, Dorflex, Tandrifax, etc.	Número de vezes: 1,2,3, etc. (N=nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano				Tamanho da sua porção. Ex.: 1 comprimido, etc.
<u>MEDICAMENTOS</u>		QUANTAS VEZES VOCÊ CONSOME	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	
Analgésico		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Anti-inflamatório		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D ○	S ○	M ○	A ○	

APÊNDICE 3 – Questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

		Com que frequência você costuma consumir?				Qual o tamanho da sua porção?	
<u>GRUPOS</u>	<u>MARCAS</u>	<u>QUANTAS VEZES VOCÊ COME:</u>	<u>UNIDADE</u>				
	Ex.: Coca-Cola, Pepsi, Antártica, Kwat etc.	Número de vezes: 1,2,3, etc. (N=nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano				Tamanho da sua porção. Ex.: 1 lata (350 mL), garrafa pequena (500 mL), um copo etc.
<u>Refrigerantes</u>		<u>QUANTAS VEZES VOCÊ CONSOME</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	
Refrigerante de cola		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Refrigerante de Guaraná		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	
Outro:		N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D	S	M	A	

APÊNDICE 4 – Questionário de sintomas habituais ao consumo de cafeína.



Questionário de sintomas relacionados ao consumo de cafeína

ID _____

Data _____

Instruções: estamos interessados em saber como você *geralmente* se sente depois de tomar cafeína na forma e quantidade costumeiras. Indique com um X a intensidade em que você sente quaisquer dos sintomas a seguir, após o consumo de cafeína. Primeiro indique na linha abaixo o tipo de fonte de cafeína que você costuma consumir e a quantidade (exemplo: uma caneca grande de café; uma lata de Red Bull).

Quando eu consumo isto _____, sinto:

	<u>Nenhum (a)</u>	<u>Pouco (a)</u>	<u>Moderado (a)</u>	<u>Alto (a)</u>	<u>Muito alto(a)</u>
1. Ansiedade	_____	_____	_____	_____	_____
2. Tensão	_____	_____	_____	_____	_____
3. Tremores	_____	_____	_____	_____	_____
4. Bem acordado	_____	_____	_____	_____	_____
5. Não consigo dormir	_____	_____	_____	_____	_____
6. Alerta	_____	_____	_____	_____	_____
7. Agitação	_____	_____	_____	_____	_____
8. Contrações musculares	_____	_____	_____	_____	_____
9. Tremores musculares	_____	_____	_____	_____	_____
10. Coração acelerado	_____	_____	_____	_____	_____
11. Coração pulando batidas	_____	_____	_____	_____	_____
12. Dor torácica	_____	_____	_____	_____	_____
13. Queimação no peito	_____	_____	_____	_____	_____
14. Estômago irritado	_____	_____	_____	_____	_____
15. Rosto corado	_____	_____	_____	_____	_____
16. Ouvidos apitando	_____	_____	_____	_____	_____
17. Dor de cabeça	_____	_____	_____	_____	_____
18. Pensamento e fala acelerados	_____	_____	_____	_____	_____

19. DESCREVA QUAISQUER OUTROS EFEITOS COLATERAIS QUE VOCÊ SINTA:



SELEÇÃO DE CICLISTAS PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO



Applied Physiology
& Nutrition
Research Group

Suplementação de cafeína, genes e performance
(sem biópsia)

Local:



ESCOLA DE
EDUCAÇÃO FÍSICA
E ESPORTE
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Av. Prof. Mello Moraes, 65
Cidade Universitária - São Paulo - SP

Aprovação no comitê de ética:
nº 71618417.1.0000.5391

O que você ganha com isso?

- Avaliação de seu desempenho aeróbio (VO_2 máx)
- Avaliação de seu desempenho em contra-relógio
- Avaliação de seus genes relacionados à suplementação de cafeína
- Participação em pesquisa de ponta

Quais os requisitos?

- Ambos os sexos
- Ter entre 18 e 40 anos
- Ter iniciado no ciclismo há pelo menos 1 ano
- Pedalar pelo menos 60km por semana
- Não ter suplementado creatina e beta-alanina nos últimos 3 meses
- 7 visitas de duração aproximada de 1 hora ao local de pesquisa
- 1 simulação de contrarrelógio de 4km a cada visita

 **Não poderão participar**

- Tabagistas e portadores de doenças crônicas

Tem interesse? Entre em contato!

 coffeclubsci@gmail.com

 (11) 93151-2787


Ciclista AMBOS OS SEXOS

Quer ajudar a ciência, ganhar um teste de VO_2 máx e uma análise genética relacionada ao metabolismo de cafeína de graça?

Participe do nosso estudo:
APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA: 71618417.1.0000.5391

- 7 visitas ao laboratório (1h30min)
- Simulação de contrarrelógio de 4km no rolo
- Suplementação com cafeína

Requisitos >>>>



Quer participar?

Você deve:

- Pedalar pelo menos 60km/semana
- Não ter doenças crônicas
- Treinar há 1 ano ou mais
- Ter entre 18 e 45 anos
- Não fumar

Contato >>>>



Entre em contato:


+55 11 93151-2787


@gabrielcasth
@tamiresnunez33


coffeclubsci@gmail.com



APÊNDICE 8 – Tabela contendo a concentração de cafeína utilizada para os cálculos

COMIDA OU BEBIDA	PORÇÃO (g ou mL)	CAF min	CAF max	CAF média (mg)	CAF mg/ml ou mg/g	FONTE
Espresso	60			59.8	0.997	CAMARGO, M.C.R. e TOLEDO, M.C.F.. TEOR DE CAFEÍNA EM CAFÉS BRASILEIROS. Ciênc. Tecnol. Aliment (1998)
Cappuccino	100			36	0.360	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Frappuccino	100	32	33	32.5	0.325	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005 // https://www.caffeineinformer.com/caffeine-content/starbucks-bottled-frappuccino
Coado	60	32.51	40.38	36.44	0.607	CAMARGO, M.C.R. e TOLEDO, M.C.F.. TEOR DE CAFEÍNA EM CAFÉS BRASILEIROS. Ciênc. Tecnol. Aliment (1998)
Instantâneo, pó	100			3142	31.420	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
French Press	100	52	196.2	124.1	1.241	Olechno et al., Influence of Various Factors on Caffeine Content in Coffee Brews. Foods 2021, 10(6), 1208
Aeropress				78	0.780	Angeloni et al., What kind of coffee do you drink? An investigation on effects of eight different extraction methods. Food Research International Volume 116, February 2019, Pages 1327-1335
Nespresso	32.5	37	110	73.5	2.262	Desbrow et al., Caffeine content of Nespresso® pod coffee. Palliative Care and Social Practice. 2019;25(1).
Outro: Latte	100			36	0.360	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Outro: Mocha	100			33	0.330	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Outro: Macchiato	100			142	1.420	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Outro: Instantâneo Capuccino, pó	100			200	2.000	USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Legacy (2018) Nutrients: Caffeine(mg) disponível em: https://www.nal.usda.gov/sites/www.nal.usda.gov/files/caffeine.pdf
Chá verde	237	30	50	45	0.190	https://www.nal.usda.gov/main/
Chá preto	237	25	110	47	0.199	https://www.stashtea.com/
Chá mate	182	8	20	13	0.071	The Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Yerba Maté (Ilex paraguariensis) Beverages https://www.researchgate.net/publication/285913526
Chimarrão	100	101	165	27	0.270	The Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Yerba Maté (Ilex paraguariensis) Beverages https://www.researchgate.net/publication/285913526
Chá gelado (Neston iced tea)	355	6.5	11.5	9	0.025	McCusker et al. Caffeine Content of Energy Drinks, Carbonated Sodas, and Other Beverages, 2006
Achocolatado (pó para preparo)	100	14.8	29.3	22.05	0.221	Juliana de Paula Lima; Nathália Cerca; Giselle Duarte; Adriana Farah et al. TEORES DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU E ACHOCOLATADOS EM PÓ COMERCIAIS. . In: ANAIS DO SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 2013, . Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2018.
Outro: Achocolatado (bebida pronta para consumo)	180			4	0.022	CAMARGO, Monica Cristiane Rojo de. Avaliação da ingestão potencial de cafeína pela população de Campinas. 1996. 131 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: < http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254982 >
RedBull	100			29	0.290	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005

APÊNDICE 8 – Tabela contendo a concentração de cafeína utilizada para os cálculos

Monster	100			33	0.330	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
TNT tradicional	200			59	0.295	www.tntenergydrink.com.br
Burn	500			160	0.320	https://www.caffeineinformer.com/the-caffeine-database
Outro: TNT pêssego	269			94	0.349	www.tntenergydrink.com.br
Chocolate ao Leite	100			66	0.660	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Chocolate meio amargo (50%)	100			43	0.430	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Chocolate meio amargo (>50%)	100	80	86	83	0.830	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Cacau em pó (100% puro)	100			230	2.300	United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Suple Cafeína	100			100	1.000	
Suple Pré-Treino	10	200	280	240	24.000	https://www.qsuplementos.com.br/
Suple CHO com cafeína	30			35	1.167	https://www.atheticanutrition.com.br/
Analgésico	1	30	50	40	40.000	Porção = 1 drágea (neosalina / dorflex) https://consultaremedios.com.br/
Antiinflamatório	1			30	30.000	Porção = 1 drágea (tanderagin / tandrilax) https://consultaremedios.com.br/
Outro: Coca-Cola	100	9	9.7	9.35	0.094	Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Quím Nova. 1995;18(4):379-81. // United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005

Outro: Coca-Cola Zero	100	11.71	12	11.85	0.119	Andrade JB, Pinheiro HLC, Lopes WA, Martins S, Amorim AMM, Brandão AM. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Quím Nova. 1995;18(4):379-81. // United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [Internet]. 2005
Outro: Coca-Cola Plus Café Espresso	220			31	0.141	https://www.cocacolabrazil.com.br/
Outro: Pepsi-Cola	350			23	0.066	Andrade JB, Pinheiro HLC, Lopes WA, Martins S, Amorim AMM, Brandão AM. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Quím Nova. 1995;18(4):379-81.

APÊNDICE 9 – Questionário de sintomas agudos para o Estudo B.

**Efeitos colaterais pré-exercício**

ID _____

Data _____

Sinto:	<u>Nenhum (a)</u>	<u>Pouco (a)</u>	<u>Moderado (a)</u>	<u>Alto (a)</u>	<u>Muito alto(a)</u>
1. Ansiedade	_____	_____	_____	_____	_____
2. Tensão	_____	_____	_____	_____	_____
3. Tremores	_____	_____	_____	_____	_____
4. Bem acordado	_____	_____	_____	_____	_____
5. Alerta	_____	_____	_____	_____	_____
6. Agitação	_____	_____	_____	_____	_____
7. Contrações musculares	_____	_____	_____	_____	_____
8. Tremores musculares	_____	_____	_____	_____	_____
9. Coração acelerado	_____	_____	_____	_____	_____
10. Coração pulando batidas	_____	_____	_____	_____	_____
11. Dor torácica	_____	_____	_____	_____	_____
12. Queimação no peito	_____	_____	_____	_____	_____
13. Estômago irritado	_____	_____	_____	_____	_____
14. Rosto corado	_____	_____	_____	_____	_____
15. Ouvidos apitando	_____	_____	_____	_____	_____
16. Dor de cabeça	_____	_____	_____	_____	_____
17. Pensamento e fala acelerados	_____	_____	_____	_____	_____
18. Desidratação	_____	_____	_____	_____	_____

19. DESCREVA QUAISQUER OUTROS EFEITOS COLATERAIS QUE VOCÊ TENHA:

**Questionário pós-exercício**

1. Qual suplemento você acredita ter ingerido hoje?
 - a. 3 mg/kg de cafeína
 - b. 6 mg/kg de cafeína
 - c. Placebo
 - d. Não sei

2. Por que?

3. Quanto você acredita que seu desempenho foi influenciado pelo tratamento?

Nada Pouco Moderadamente Muito Extremamente

4. Por que?

APÊNDICE 11 – Poster contendo imagens de medidas caseiras e porções utilizado para a realização do questionário de frequência alimentar de produtos fonte de cafeína.

USP

Qual é a sua porção?

Medidas caseiras para quantificação do consumo de café



 50ml	 50ml	 75ml	
 150ml	 150ml	 150ml	 180ml
 200ml	 200ml	 250ml	 350ml
 200ml	 300ml	 400ml	