

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTAS DE MARCADORES MUSCULARES,
COMPORTAMENTO E TRANSPORTADORES DE
MONOCABOXILATOS DE RATOS SOB CONDIÇÃO DE
*OVERREACHING***

Henriette Gellert Moranza

Bióloga

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTAS DE MARCADORES MUSCULARES,
COMPORTAMENTO E TRANSPORTADORES DE
MONOCABOXILATOS DE RATOS SOB CONDIÇÃO DE
OVERREACHING**

Henriette Gellert Moranza

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

Coorientadora: Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutora em Zootecnia

2021

M829r

Moranza, Henriette Gellert

Respostas de marcadores musculares, comportamento e transportadores de monocarboxilatos de ratos sob condição de overreaching / Henriette Gellert Moranza. -- Jaboticabal, 2021
107 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz

Coorientadora: Fúlvia de Barros Manchado Gobatto

1. Exercícios físicos. 2. Saúde. 3. Aptidão física. 4. Ratos Wistar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RESPOSTAS DE MARCADORES MUSCULARES, COMPORTAMENTO E TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATOS DE RATOS SOB CONDIÇÃO DE OVERREACHING

AUTORA: HENRIETTE GELLERT MORANZA

ORIENTADOR: GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

COORDINADORA: FÚLVIA DE BARROS MANCHADO GOBATTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. GUSTAVO GOMES DE ARAUJO (Participação Virtual)
Universidade Federal de Alagoas, Educação Física / Maceió/AL

Prof.Dr. WALTER HEINZ FERINGER JUNIOR (Participação Virtual)
Universidade de Araraquara (UNIARA) / Araraquara/SP

Profa. Dra. KÊNIA CARDOSO BÍCEGO (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 30 de abril de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Henriette Gellert Moranza, Campinas, 13/09/1990 – nascida em Campinas, São Paulo, em 13 de setembro de 1990, filha de Paulo Célio Moranza e Lillian Gellert Moranza. Realizou sua graduação em Ciências Biológicas, modalidade Bacharel na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP). Concluiu seus estudos e obteve o título de Bacharela em Ciências Biológicas em fevereiro de 2014. Durante sua graduação realizou estágio na Embrapa meio ambiente - Jaguariúna, SP- sendo bolsista de Iniciação Científica do CNPq durante os anos 2011 e 2012 sob orientação do Mst. Laerte Scanavaca Júnior. Ainda na graduação, no período de 2011 a 2014, em conjunto com a Embrapa Meio Ambiente (2011 a 2012) realizou estágio no Laboratório de Fisiologia do Exercício e Farmacologia (LAFEQ) sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz. Neste período desenvolveu projeto relacionados a plantas medicinais, fitoterápicos, fisiologia do exercício e comportamento animal em ratos Wistar. Ingressou no mestrado em março de 2015, no curso de Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, onde obteve o título de Mestra em Zootecnia em dezembro de 2016 pela FCAV-UNESP – campus Jaboticabal. Em março de 2017, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na mesma instituição, na área de Metabolismo Animal como bolsista CNPQ, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz e coorientação da Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto, realizando experimentos em colaboração com a Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas.

“Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo.
A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países,
porque a crise traz progressos.
É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias.
Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e
respeita mais os problemas do que as soluções.
Sem crise não há desafios; sem desafios, a vida é uma rotina. Sem crise não há
mérito.
É na crise que se aflora o **melhor** de cada um”

Albert Einstein

DEDICO

Aos meus pais, **Paulo Célio Moranza** e **Lillian Gellert Moranza** pelo exemplo de vida e pelo apoio, por todo amor e carinho incondicionais. Devo a vocês tudo que sou hoje.

Aos meus irmãos, **Paulo Célio Moranza Júnior** e **Raissa Gellert Moranza**, por estarem sempre ao meu lado, por me apoiarem e serem pessoas maravilhosas em que eu me espelho.

Em especial, Dedico com todo meu *Amor e Coração*, ao presente que Deus me deu nesta jornada, meu afilhado **Leonardo (Léo)**, meu pequeno anjo, que me proporcionou o privilégio de sentir o amor mais doce e puro.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me proporcionar coisas maravilhosas, por me amparar em momentos difíceis e colocar pessoas incríveis em meu caminho;

Ao **Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz**, meu querido orientador, por toda orientação durante estes onze anos. Pelos ensinamentos, conselhos, pela amizade e por me ajudar sempre a subir cada degrau desta caminhada com paciência e sabedoria;

À **Profa. Dra. Fúlvia Gobatto**, minha querida coorientadora, por toda orientação, paciência, ensinamentos, conselhos, pela amizade e por sempre estar disposta a me ajudar;

Ao **Prof. Dr. Claudio Gobatto**, meu orientador de coração, por todos seus ensinamentos e pela amizade.

À banca examinadora da defesa da dissertação, **Profa. Dra. Kênia Bicego, Profa. Dra. Lizandra Amoroso, Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo e Prof.Dr. Walter Heinz Feringer Junior** pela disponibilidade e contribuições.

Aos meus “irmãos” do coração: **Stela e Gabriel, Fernanda e Pedro** por estarem ao meu lado sempre em todos os momentos, mesmo de longe, por tudo que já vivemos juntos e que ainda vamos viver. Amo vocês.

A **Maria Isabel Mataqueiro**, pela amizade.

Aos amigos do LAFEQ e da equipe *overtraining*, que nos ajudaram a conseguir desenvolver este trabalho com muito esforço e dedicação, tornando sempre nossos dias por mais difíceis que fossem, mais alegres: **Malú, Gabriel, Júlia, Thaís, Walter, Lucas, Alejandro, Juliana, Naila, Patrícia Sitta, Patrícia Testa, Fernanda, Manoela e Mayara**.

Aos membros do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal: **Rodrigo, Clidão e Damaris**, que sempre estiveram à disposição para me ajudar.

À equipe do Laboratório de Neuroendocrinologia do Estresse e Reprodução da Universidade de São Paulo (USP/ Ribeirão Preto), em especial ao Prof.Dr. **Celso Rodrigues Franci** e ao **Procópio Filho** pelo auxílio fornecido neste estudo.

À equipe do Laboratório de Bioquímica do Exercício - LABEX - da Universidade de Estadual de Campinas (UNICAMP), em especial a **Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo** pelo auxílio e colaboração fornecidos para realização deste estudo.

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte - LAFAE - da Universidade de Estadual de Campinas (UNICAMP- Limeira), em especial, ao Pós-doutorando **Pedro Scariot** pelo auxílio, orientação, ensinamentos, por toda ajuda, amizade e colaboração fornecidos para realização deste estudo.

Ao meu grande amigo e namorado, Paulo, por todo companheirismo e amor.

A toda minha família: Avós e avôs que já partiram e estão sempre olhando por mim, aos tios e tias, primos e prima, cunhado (Junão).

Ao programa de Zootecnia da FCAV-UNESP pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao CNPq pela Bolsa de Doutorado concedida para o desenvolvimento desta dissertação (nº processo: 141287/2017-9).

SUMÁRIO

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LIRATURA	4
2.1. <i>Overreaching</i> funcional (FOR), não funcional (NFOR) e síndrome do <i>overtraining</i> (SOT)	4
2.2. Citrato sintase	10
2.3. Glicogênio muscular e hepático	11
2.4. Corticosterona	12
2.5. Aspectos comportamentais	14
2.6. Lactato	16
2.7. Transportadores monocarboxilatos MCT1 e MCT4 e proteína auxiliar CD147	18
3. OBJETIVO GERAL	21
3.1. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Animais e manejo.....	22
4.1.1. Composição básica da ração Presence®	22
4.2. Protocolo de <i>overtraining</i> (PO)	23
4.3. Testes máximos de performance (TMP)	25
4.4. Quantificação da do desempenho individual.....	27
4.5. Distinção do grupo treinado em FOR e NFOR	27
4.6. Citrato sintase	31
4.6.1. <i>Western Blotting</i>	31
4.7. Glicogênio muscular e hepático	32
4.8. Corticosterona	32
4.9. Testes comportamentais	33
4.10. Mensurações de lactato e glicose sanguíneos	35
4.11. Índices somáticos	35
4.12. Análises biomoleculares de transportadores de monocaboxilatos (MCT1 e MCT4) e da proteína auxiliar CD147 em ratos Wistar	36

4.12.1.	Extração das proteínas	36
4.12.2.	Quantificação de proteínas totais	37
4.12.3.	Eletroforese	37
4.12.4.	<i>Western Blotting</i> das proteínas MCT1, MCT4 e CD147	38
4.12.5.	Análise de componentes principais (ACP)	38
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6.	RESULTADOS	40
6.1.	Massa Corporéa dos grupos durante os TMPs	40
6.2.	Desempenho dos grupos de TMP-1 a TMP-9	42
6.3.	Atividade e conteúdo protéico da Citrato Sintase (CS)	45
6.4.	Glicogênio muscular e hepático	46
6.5.	Corticosterona	52
6.6.	Comportamento	53
6.7.	Lactato sanguíneo e Glicose	56
6.8.	Índices somáticos	60
6.9.	Conteúdo das proteínas MCT1, MCT2 e CD 147 no músculo gastrocnêmio (porção branca)	63
7.	DISCUSSÃO	66
8.	CONCLUSÃO	73
9.	REFERÊNCIAS	74

“RESPOSTAS DE MARCADORES MUSCULARES, COMPORTAMENTO E TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATOS DE RATOS SOB CONDIÇÃO DE OVERREACHING”

RESUMO - Incrementos na carga de treino são realizados com intuito de melhorar o desempenho esportivo, sendo que, frequentemente, as prescrições crônicas de sessões de treino podem exceder a capacidade física do atleta. A síndrome do *overtraining* (SOT), induzida pelo desequilíbrio no ciclo estímulo-recuperação, é importante causa da redução do desempenho esportivo dos atletas. Protocolos de indução *overtraining* em modelos experimentais para investigação de alterações comportamentais bem como alterações em marcadores musculares associados a alterações nos transportadores de monocarboxilatos 1 e 4 (MCT1 e MCT4) no músculo esquelético, são escassos. O propósito da presente Tese foi auxiliar a compreender as possíveis alterações comportamentais, bioquímicas, marcadores musculares e transportadores de monocarboxilatos que podem contribuir efetivamente para o desencadeamento da condição NFOR/SOT induzido pelo desequilíbrio entre carga externa e períodos de recuperação. Utilizaram-se ratos machos, jovens, como massa corporal inicial entre 150 e 200g, distribuídos nos grupos: ativo (AT, n = 16); treinados (TR, n = 33). Os ratos deste último grupo manifestaram as condições *overreaching* funcional (FOR, n = 19) e *overreaching* não funcional (NFOR, n = 14). O grupo AT foi submetido a um programa de condicionamento leve. O grupo TR realizou o protocolo de *overtraining* (PO), que consistiu em 12 semanas de treinamento em esteira, dividido em 5 fases (F1-F5). A F1 foi elaborada por 4 semanas de aumento progressivo de velocidade e duração das sessões de treino; a F2 durou 4 semanas, sendo mantidas a velocidade e a duração atingidas no final da F1. Nas fases 3, 4 e 5 foram aumentadas a frequência das sessões diárias (2, 3, 4/dia), reduzindo-se o período de recuperação entre estas (4, 3 e 2 horas, respectivamente), levando ao desequilíbrio entre esforço físico e recuperação. Para avaliação da aptidão física, os ratos foram submetidos a nove testes máximos de performance (TMP). Logo após os TMP-7, oito ratos de cada grupo experimental foram submetidos à eutanásia para coleta de amostras de sangue para análise de corticosterona e lactato, bem como coletas musculares e hepáticas para análises de glicogênio, citrato sintase e expressão dos MCTs. Ao final do PO, todos os grupos foram submetidos a análises comportamentais. Aplicou-se General Linear Model (GLM) para as variáveis endócrinas, desempenho, massa corporal, lactato e glicose. Para as variáveis glicogênio e corticosterona entre TMP-7 e TMP-9 aplicou-se ANOVA-two way. As análises de componentes principais (ACP) foram baseadas na matriz de correlação entre as variáveis. Após as três semanas adaptativas, foi obtido percentual de ratos corredores de 75%. Com relação aos resultados, constataram-se valores inferiores de massa corporal (MC) para os grupos FOR e NFOR em relação ao grupo AT ($P < 0,001$), sendo que em TMP-8 houve redução notória do grupo NFOR em relação ao grupo AT ($P < 0,01$). No que se refere ao desempenho, os grupos FOR e NFOR aumentaram a sua aptidão física a partir do

TMP-2 ($P < 0,001$). FOR e NFOR começaram a se diferenciar a partir do TMP-5 ($P < 0,001$), sendo que este comportamento permaneceu até o TMP-7 ($P < 0,001$). NFOR teve redução notória de desempenho no TMP-7 ($P = 0,001$). Não houve diferença significativa na atividade bem como na quantificação proteica da citrato sintase pela técnica de *western blotting* entre os grupos AT, FOR e NFOR. Com relação ao glicogênio, houve redução dos estoques no músculo sóleo dos grupos FOR e NFOR e redução no músculo gastrocnêmio medial para o NFOR em relação ao AT. O grupo NFOR apresentou uma redução do glicogênio no músculo gastrocnêmio lateral de TMP-7 para TMP-9. Todos os grupos apresentaram significativa depleção de glicogênio no músculo semimembranáceo em TMP-9. Redução do glicogênio hepático para os grupos FOR e NFOR de TMP-7 para TMP-9 também foram observadas. Houve aumento nas concentrações de corticosterona para todos os grupos em TMP-9 quando comparado ao TMP-7. A análise de componentes principais (ACP) revelou que o comportamento foi responsável por 63,48% da variância observada para o teste de campo aberto. Para o teste de labirinto em cruz elevado, os dois componentes principais foram responsáveis por 94,1% da variância observada. Houve redução nas concentrações de lactato e da glicose para os grupos FOR e NFOR em TMP-6. Pode-se observar redução da expressão da isoforma MCT4 para grupo NFOR. Para os índices somáticos, em uma análise ACP em TMP-7, os dois componentes principais foram responsáveis por 72,22% da variação sendo que a disposição gráfica das variáveis para os grupos evidenciou separação dos grupos AT, FOR e NFOR. Em conclusão, nosso estudo demonstrou que o protocolo de overtraining utilizado induziu reduções nas concentrações de MCT4 no grupo NFOR. Nos testes máximos e submáximos, obtivemos reduções nas concentrações de lactato e redução nas concentrações glicose em TMP-6. Ademais, observou-se depleção de glicogênio em uma análise geral. A análise de ACPs tanto comportamentais quanto de índice somáticos se mostraram eficazes e promissoras na identificação e separação dos grupos FOR e NFOR.

Palavras chave: citrato sintase, exercício físico, músculo, esteira, glicogênio, ratos Wistar, síndrome de *overtraining*

“RESPONSES FROM MUSCLE MARKERS, BEHAVIOR AND MONOCARBOXYLATE CARRIERS OF RATS UNDER OVERREACHING CONDITION”

ABSTRACT – Increments in the training load are carried out in order to improve sports performance, and the chronic prescriptions of training sessions can often exceed the athlete's physical capacity. The overtraining syndrome (SOT), induced by the imbalance in the stimulus-recovery cycle, is an important cause of reduced athletes' sporting performance. Overtraining induction protocols in experimental models for investigating behavioral changes as well as changes in muscle markers associated with changes in monocarboxylate transporters 1 and 4 (MCT1 and MCT4) in skeletal muscle are scarce. The purpose of this Thesis was to help understand the possible behavioral, biochemical, muscle markers and monocarboxylate transporters that can effectively contribute to the triggering of the NFOR / SOT condition induced by the imbalance between external load and recovery periods. Young male rats were used as initial body mass between 150 and 200g, distributed in the groups: active (AT, n = 16); trained (TR, n = 33). The rats in the latter group showed the conditions of functional overreaching (FOR, n = 19) and non-functional overreaching (NFOR, n = 14). The AT group was submitted to a light conditioning program. The TR group performed the overtraining protocol (PO), which consisted of 12 weeks of treadmill training, divided into 5 phases (F1-F5). F1 was designed for 4 weeks of progressive increase in speed and duration of training sessions; F2 lasted 4 weeks, maintaining the speed and duration reached at the end of F1. In phases 3, 4 and 5 the frequency of daily sessions was increased (2, 3, 4 / day), reducing the recovery period between these (4, 3 and 2 hours, respectively), leading to an imbalance between physical effort and recovery. To assess physical fitness, the rats were subjected to nine maximum performance tests (TMP). Right after TMP-7, eight rats from each experimental group were euthanized to collect blood samples for analysis of corticosterone and lactate, as well as muscle and liver collections for analyzes of glycogen, citrate synthase and expression of MCTs. At the end of the PO, all groups were subjected to behavioral analysis. General Linear Model (GLM) was applied for the endocrine variables, performance, body mass, lactate and glucose. For the variables glycogen and corticosterone between TMP-7 and TMP-9, ANOVA-two way was applied. Principal component analyzes (PCA) were based on the correlation matrix between variables. After the three adaptive weeks, a percentage of runner rats of 75% was obtained. Regarding the results, lower values of body mass (BM) were found for the FOR and NFOR groups in relation to the AT group ($P < 0.001$), whereas in TMP-8 there was a notable reduction in the NFOR group in relation to the AT group ($P < 0.01$). Regarding performance, the FOR and NFOR groups increased their physical fitness from TMP-2 ($P < 0.001$). FOR and NFOR started to differentiate from TMP-5 ($P < 0.001$), and this behavior remained until TMP-7 ($P < 0.001$). NFOR had a noticeable reduction in performance in TMP-7 ($P = 0.001$). There was no significant difference in activity as well as in protein quantification of citrate synthase using the western blotting technique between groups AT, FOR and NFOR. Regarding glycogen, there was a reduction in stocks in the soleus muscle of the FOR and NFOR groups and a reduction in the medial gastrocnemius muscle for the NFOR in relation to the AT. The NFOR group showed a reduction in glycogen in the lateral gastrocnemius muscle from TMP-7 to TMP-9. All groups showed significant glycogen depletion in the semimembrane muscle in TMP-9. Reduction of hepatic glycogen for

the FOR and NFOR groups from TMP-7 to TMP-9 was also observed. There was an increase in corticosterone concentrations for all groups in TMP-9 when compared to TMP-7. Principal component analysis (PCA) revealed that the behavior was responsible for 63.48% of the variance observed for the open field test. For the elevated plus-maze test, the two main components were responsible for 94.1% of the observed variance. There was a reduction in lactate and glucose concentrations for the FOR and NFOR groups in TMP-6. A reduction in the expression of the MCT4 isoform can be observed for the NFOR group. For somatic indices, in an ACP analysis on TMP-7, the two main components were responsible for 72.22% of the variation, with the graphic layout of the variables for the groups showing separation of the AT, FOR and NFOR groups. In conclusion, our study demonstrated that the overtraining protocol used induced reductions in MCT4 concentrations in the NFOR group. In the maximum and submaximal tests, we obtained reductions in lactate concentrations and reduction in glucose concentrations in TMP-6. In addition, glycogen depletion was observed in a general analysis. The analysis of both behavioral and somatic index ACPs proved to be effective and promising in the identification and separation of the FOR and NFOR groups.

Keywords: citrate synthase, physical exercise, muscle, treadmill, glycogen, Wistar rats, overtraining syndrome

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Efeitos da indução da síndrome do supertreinamento sobre o comportamento, corticosterona e expressão de transportadores monocarboxilatos em ratos wistar**", protocolo nº 23593/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado e foi aprovado "Ad-referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP.

Vigência do Projeto	20/01/2016 a 20/12/2016
Espécie / Linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> Linhagem Wistar
Nº de animais	100 animais
Peso / Idade	150 g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Unesp (Botucatu)

Jaboticabal, 05 de janeiro de 2016.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sinais e sintomas relacionados à NFOR/SOT.....	9
Tabela 2. Protocolo utilizado durante o programa de condicionamento de ratos Wistar para o desenvolvimento da NFOR/SOT (adaptado de Hohl et al., 2009).	25
Tabela 3. Análise descritiva da performance (Kg.m) dos grupos nos TMP-8 e TMP-9 de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching.	43
Tabela 4. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de citrato sintase de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching.	45
Tabela 5. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de glicogênio do músculo sóleo de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching...	47
Tabela 6. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de glicogênio do músculo gastrocnêmio ventre medial de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching.	48
Tabela 7. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis do conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio ventre lateral de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching.	49
Tabela 8. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis do conteúdo de glicogênio do músculo semimenbranáceo de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching.	50
Tabela 9. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de glicogênio do fígado de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching.	51
Tabela 10. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de corticosterona de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching.	52
Tabela 11. Análise descritiva e efeito do tratamento do conteúdo de proteínas MCT1, MCT4 e CD147 de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de overreaching.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama demonstrando as etapas de um ciclo de treinamento e condicionamento físico (Fonte: O autor).....	6
Figura 2. Possíveis resultados do treinamento, resultando em overreaching funcional, overreaching não funcional e síndrome do overtraining (Fonte: Adaptado de Meeusen et al., 2013).....	8
Figura 3. Transportes realizados pelos MCT1-4. A figura demonstra a estrutura do MCT1 interagindo com a proteína auxiliar CD147 na membrana celular (Fonte: Payen et al. 2020).....	19
Figura 4. Imagem da esteira motorizada para roedores (AVS®) utilizada para desenvolvimento do protocolo de treinamento (Fonte: Arquivo pessoal).....	24
Figura 5. Representação de um teste máximo de performance (TMP) com incrementos no tempo e velocidade em esteira (Fonte: O autor).....	26
Figura 6. Diagrama demonstrando o momento em que cada um dos nove testes de performance máximos aplicados (TMP) foram realizados durante o protocolo de overtraining (PO) (Fonte: O autor).....	26
Figura 7. Histograma de distribuição dos grupos de ratos Wistar machos após TMP-7; NFOR, overreaching não funcional (n=14); FOR, overreaching funcional (n=19). Seta vermelha: indica o α crítico de -0,98 kg.m utilizado para classificação dos grupos...	28
Figura 8. Representação da quantificação individual do grau de inclinação (α), obtido a partir de função linear ($y = ax+b$), de três ratos Wistar, respectivamente dos grupos AT (Gráfico A), FOR (Gráfico B) e NFOR (Gráfico C), após TMP-7. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional.	29
Figura 9. Fluxograma do experimento. D, desempenho (kg.m); AT, grupo ativo; TR, grupo treinado; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional; TMP, teste máximo de performance; sem., semana; RP, recuperação passiva (Fonte: O autor).....	30
Figura 10. Teste de labirinto em cruz elevado	34
Figura 11. Teste de campo aberto.....	35
Figura 12. Massa corpórea (MC) ao longo dos TMP-1 a 9 nos diferentes tratamentos. De TMP-1 a 7: AT, n=16; FOR, n=19; NFOR, n=14. TMP-8 e 9: AT, n=8; FOR, n=11; NFOR, n=6. *Redução dos grupos FOR e NFOR em relação ao AT. # Redução do grupo NFOR em relação ao AT. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional; TMP, teste máximo de performance.	41
Figura 13. Performance ao longo dos TPM-1 a 9 nos diferentes tratamentos. De TMP-1 a 7: AT, n=16; FOR, n=19; NFOR, n=14. TMP-8 e 9: AT, n=8; FOR, n=11; NFOR, n=6. # Indica redução de desempenho intragrupo em relação ao TMP-7 ($P < 0,05$). * Indica redução de desempenho intragrupo em relação ao TMP-6 ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$). AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i>	

funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional; TMP, teste máximo de performance.	43
Figura 14. Performance em TMP-8 e 9 nos diferentes tratamentos. TMP-8 e 9: AT, n=8; FOR, n=11; NFOR, n=6. AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional; TMP, teste máximo de performance.	44
Figura 15. Atividade da citrato sintase dos ratos dos grupos AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional e NFOR, <i>overreaching</i> não funcional. Dados em média $\pm$ desvio padrão.	45
Figura 16. Western blotting da citrato sintase relativizada por GAPDH dos grupos AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional e NFOR, <i>overreaching</i> não funcional.	46
Figura 17. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio do músculo sóleo considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional; TMP, teste máximo de performance.	47
Figura 18. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio ventre medial considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional; TMP, teste máximo de performance.	48
Figura 19. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio ventre lateral considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional. TMP, teste máximo de performance.	49
Figura 20. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio do músculo semimenbranáceo considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional; TMP, teste máximo de performance.	50
Figura 21. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio hepático considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional; TMP, teste máximo de performance.	51
Figura 22. Comparação dos tratamentos dentro de cada variável (TMP-7 e TMP-9). AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional; TMP, teste máximo de performance.	52
Figura 23. Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes principais dos 6 parâmetros ambientais em campo aberto com elipses de confiança de 95% agrupadas pelos três grupos. AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i> funcional; NFOR, <i>overreaching</i> não funcional.	54
Figura 24. Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes principais dos 8 parâmetros ambientais divididos no primeiro e segundo labirinto positivo com elipses de confiança de 95% agrupadas pelos três grupos. AT, ativo; FOR, <i>overreaching</i>	

funcional; NFOR, overreaching não funcional. 1ºEPM, 1º teste de labirinto em cruz elevado; 2ºEPM, 2º teste de labirinto em cruz elevado.55

Figura 25. Lactato ao longo das variáveis nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferença entre grupos. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional. TMP, teste máximo de performance.56

Figura 26. Lactato ao longo das variáveis nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferença entre grupos. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional.57

Figura 27. Glicose ao longo das variáveis nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferença entre grupos. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional. TMP, teste máximo de performance.58

Figura 28. Glicose ao longo das variáveis nos diferentes tratamentos. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional.59

Figura 29. Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes principais dos 4 parâmetros ambientais em TMP-7 com elipses de confiança de 95% agrupadas pelos três grupos. CI, índice cardiossomático; AI, índice adrenossomático; TI, índice timossomático; HI, índice hepatossomático. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional.61

Figura 30. Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes principais dos 4 parâmetros ambientais em TMP-9 com elipses de confiança de 95% agrupadas pelos três grupos. CI, índice cardiossomático; AI, índice adrenossomático; TI, índice timossomático; HI, índice hepatossomático. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional.62

Figura 31. A: Imagem e gráfico de Western Blotting da proteína transportadora de monocarboxilato 1 (MCT1 – 55 kDa) nos diferentes tratamentos. B: Imagem e gráfico de Western Blotting da proteína transportadora de monocarboxilato 4 (MCT4 – 57 kDa) nos diferentes tratamentos. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional.64

Figura 32. Imagem e gráfico de Western Blotting da proteína CD 147 (28 kDa) nos diferentes tratamentos. B: Imagem e gráfico de Western Blotting da proteína CD 147 (57 kDa) nos diferentes tratamentos. C: Imagem e gráfico de Western Blotting da proteína CD 147 (60 kDa) nos diferentes tratamentos. AT, ativo; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional65

LISTA DE ABREVIATURAS

SOT- Síndrome do *overtraining*
UUPS - *Unexplained Underperformance Syndrome*
NFOR – *Overreaching* não funcional
FOR – *Overreaching* funcional
AT - Ativo
OT – *Overtraining*
CS – Citrato sintase
GV – Gastrocnêmio vermelho
MCTs – Transportadores de monocarboxilatos
MCT 1 – Transportador de monocarboxilato 1
MCT 4 – Transportador de monocarboxilato 4
CD 147 - *Cluster of Differentiation 147*
PO – Protocolo de *overtraining*
F1 – Fase 1
F2 – Fase 2
F3 – Fase 3
F4 – Fase 4
F5 – Fase 5
RP1 – semana de recuperação passiva 1
RP2 – semana de recuperação passiva 2
CA – Teste de campo aberto
LCE – Teste de labirinto em cruz elevado
TMP – Teste máximo de performance
POMS - Perfil de Estado de Humor (*Profile mood states*)
REST-Q - Questionário de Estresse- Recuperação
RPE - Escala de Percepção do esforço de Borg
[lac] – Concentração de lactato
[glic] – Concentração de glicose
AI - Índice adrenossomático
CI- Índice cardiossomático
HI – Índice hepatossomático
TI – Índice timossomático

RP – Recuperação passiva

ACP – Análise de componentes principais

HHa – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

MC – Massa corporal

i.p – Via intraperitoneal

GLM - General Linear Model

ACP – Análise de componentes principais

1. INTRODUÇÃO

Incrementos no volume e intensidade de exercício são realizados por treinadores com propósito de melhorar o desempenho esportivo. Quando prescritos períodos de descanso e recuperação adequados, um cronograma de treinamento altamente exigente pode proporcionar enormes benefícios (Carfagno e Hendrix, 2014). Contudo, não raro, a incessante busca pela maximização do desempenho excede a capacidade física e psicológica do atleta (Schwellnus et al., 2016), sendo que o nível de estresse físico se torna maior do que o corpo pode suportar, e esses fatores podem ocasionar desequilíbrios como a síndrome de *overtraining* (SOT) (Myrick, 2015).

O *overtraining* (OT) é caracterizado como processo contínuo de intensificação do programa de treino com possível indução do *overreaching* funcional (FOR), *overreaching* não funcional (NFOR) ou síndrome de *overtraining* (SOT) (Meeusen et al., 2013; Cheng et al., 2020). FOR é caracterizado um período agudo em que a carga de treinamento (volume x intensidade) é significativamente aumentada, com períodos de recuperação adequada, produzindo adaptações fisiológicas positivas e melhoria de desempenho. Esse processo é conhecido no meio esportivo como “supercompensação” (Carfagno e Hendrix, 2014; Cadegiani et al., 2020). Por outro lado, o NFOR é caracterizado por um período de sobrecarga de treinamento seguido por uma recuperação inadequada, ocasionando um decréscimo no desempenho atlético (Myrick, 2015; Cadegiani et al., 2020). Se não respeitado um importante interstício de recuperação, com intervalos de descanso adequados sendo introduzidos no programa de treinamento, o NFOR pode progredir, ao longo do tempo, para a SOT (Carfagno e Hendrix, 2014; Cheng et al., 2020). Desse modo, a distinção entre NFOR e SOT é tênue e é determinada pela duração do tempo necessário para a recuperação dos indivíduos (Carfagno e Hendrix, 2014).

Sabe-se que os atletas que realizam atividades esportivas de longa duração, em especial, apresentam incidência alta de NFOR/SOT (Myrick, 2015). Inúmeras alterações fisiológicas e comportamentais são descritas na condição NFOR/SOT, como depressão, ansiedade, irritabilidade, distúrbios do sono, falta de motivação,

fadiga geral, perda de apetite e de massa corporal, alterações na frequência cardíaca e pressão arterial, susceptibilidade a infecções e diminuição das concentrações de lactato em testes máximos e submáximos (Graaf-roelfsema et al., 2007; Carfagno e Hendrix, 2014, Myrick, 2015; Grandou et al., 2020).

Esses sintomas resultam em distúrbios multissistêmicos, incluindo os sistemas neurológico, psicológico, imunológico, endócrino bem como musculoesquelético (Myrick, 2015). Permitir intervalo de descanso e em seguida sujeitar o atleta a um teste de desempenho, é o único meio atual de diagnosticar NFOR/SOT, já que nenhum biomarcador confiável foi estabelecido como diagnóstico desses fenômenos multifatoriais (Myrick, 2015). Atletas de elite e treinadores precisam de métodos simples para prevenção e diagnóstico da NFOR/SOT. Dentro deste contexto, identificar marcadores que se correlacionam com NFOR/SOT pode interromper a progressão de um ciclo potencialmente negativo (Carfagno e Hendrix, 2014).

Uma das enzimas envolvidas no metabolismo muscular observada nas condições FOR e NFOR/SOT é a citrato sintase (CS), enzima que compõe a matriz mitocondrial, sendo caracterizada como marcador da capacidade oxidativa mitocondrial muscular (Dias, 2019). Estudos demonstraram diferentes comportamentos da atividade enzimática da CS muscular em roedores NFOR/SOT e FOR evidenciando respectivamente redução e elevação de sua atividade nessas diferentes condições (Hohl et al., 2009; Ferraresso et al., 2012).

Sabendo que as alterações comportamentais podem ser um dos principais sintomas da NFOR/SOT, outro aspecto importante, é a relação entre exercício e as alterações psíquicas, sendo que o esforço físico intenso pode afetar, de maneira negativa, o estado de humor do atleta (Sakuragi e Sugiyama, 2006; Gandrou et al., 2020). Com relação as alterações hormonais e comportamento, modificações nas concentrações de cortisol (humanos) e de corticosterona (ratos) revelam que as concentrações de tais hormônios podem ser importantes indicadores de estresse (Möstl e Palme, 2002; Contarteze et al., 2007; Nollet et al., 2020).

O glicogênio, por sua vez, tem função primordial no armazenamento de energia, sendo encontrado em diversos tecidos, com maior concentração nos músculos esqueléticos, especialmente naqueles compostos em grande parte por fibras glicolíticas tipo II e no fígado (Cheng et al., 2020). Estudos têm sugerido diversas

hipóteses para explicar causas intramusculares subjacentes da condição NFOR/SOT, sendo uma delas a depleção de glicogênio. Esta hipótese estabelece que a redução nas concentrações de glicogênio induzidas pelo exercício físico está intimamente relacionada à redução no desempenho (Cheng et al., 2020). Em equinos, protocolo de treinamento intenso de 34 semanas seguido por período de 12 semanas de descanso, evidenciou depleção na concentração de glicogênio muscular (Mcgowan et al., 2002). Todavia, a depleção do glicogênio em estados de NFOR/SOT continua pouco compreendida.

Na musculatura, a concentração de lactato é o resultado da sua dinâmica dentro e fora das células (Nikooie et al., 2013). A principal via para transporte de lactato é mediada pela família de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), descrita há mais de trinta anos por Brooks (Juel e Halestrap, 1999; Nikooie et al., 2013; Proia et al., 2016). Na espécie humana e roedores, a isoforma MCT1 é principalmente expressa nas fibras oxidativas (Tipo I). A isoforma MCT4 se expressa notadamente em fibras glicolíticas (Tipo II), sendo responsável pelo efluxo do lactato do músculo, incluindo o que ocorre nas fibras musculares esqueléticas brancas durante o exercício intenso, astrócitos, células imunes, condrócitos e células hipóxicas (Mikkänen, 2011; Proia et al., 2016, Payen et al, 2020). Para que ocorra a expressão normal de MCT1 e MCT4, faz-se necessária a atuação da proteína CD147 (*Cluster of Differentiation 147*), uma glicoproteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas (Halestrap, 2012).

A expressão dos MCTs é regulada por diversos estímulos. A atividade física e hipóxia ampliam sua quantidade, ao passo que a desnervação e a hiperlactatemia têm efeito negativo (Nikooie et al., 2013). Neste âmbito, o treinamento físico de alta intensidade pode provocar, em humanos e equinos, aumento da expressão de MCT1, MCT4 e CD147 no músculo esquelético (Kitaoka et al., 2011), favorecendo a regulação do pH e a manutenção da contração muscular. Entretanto, o papel fisiológico das diferentes intensidades e volumes de exercício relacionados à expressão dessas proteínas no músculo esquelético necessita estudos adicionais (Frollini et al., 2008). Até o presente momento, embora investigação com diferentes intensidades de treinamento sobre MCTs 1 e 4 tenha sido conduzida (Forte et al., 2020), nenhum trabalho relacionado às alterações em MCTs no músculo esquelético

de ratos submetidos a protocolos de intensificação de treino para indução de *overtraining* foi encontrado na literatura compulsada.

Devido a questões éticas, experimentos de indução de NFOR/SOT são realizados principalmente em modelos experimentais. Além disso, nota-se dificuldade em encontrar atletas voluntários que se submetam a um treinamento extenuante, o qual pode causar redução em seu desempenho e colocar em risco sua carreira atlética (Hohl et al., 2009). O emprego de modelos animais possibilita estudos mais homogêneos, invasivos e extensivos em relação à modelos humanos. Dentro deste contexto e somado ao número reduzido de pesquisas que envolvam FOR e NFOR/SOT e os seus possíveis resultados, mais especificamente na temática supramencionada, observa-se uma carência de estudos na área.

Desta maneira, pensando na lacuna existente na literatura no que se refere a protocolos de avaliação e diagnóstico do NFOR/SOT, o intuito da presente pesquisa foi avaliar se tais condições poderiam ser resultado de baixas concentrações de glicogênio muscular ou hepático, se as mesmas afetam de maneira efetiva a atividade enzimática da citrato sintase, concentrações glicose e lactato e se poderiam modular a atividade e expressão dos transportadores monocarboxilatos (MCT1 e MCT4). Ademais, avaliamos também o comportamento frente a estas condições em ratos Wistar.

2. REVISÃO DE LIRATURA

2.1. *Overreaching* funcional (FOR), não funcional (NFOR) e síndrome do *overtraining* (SOT)

O esporte evoluiu com o tempo para uma indústria competitiva e profissionalizada, na qual atletas de elite enfrentam pressões cada vez maiores estando sujeitos a calendários de competição bastante saturados, induzindo à aplicações de altas cargas de treinamento (Soligard et al., 2016). A síndrome de *overtraining*, que foi descrita em 1923, tem sido considerada uma enfermidade enigmática desde sua descoberta (Carfagno e Hendrix, 2014). Apesar do notório

interesse da comunidade científica sobre a compreensão da NFOR/SOT, este ainda é um fenômeno pouco compreendido entre os pesquisadores (Birrer et al., 2013).

Nos artigos que abordam protocolos de treinamento na espécie humana, frequentemente os autores utilizaram o conceito de carga externa ou interna, para elaboração dos programas de treino. O conceito de carga considera volume e intensidade para prescrição do treino. Carga externa é representada pela duração, distância percorrida, velocidade média e máxima, inclinação da esteira, variáveis que induzem respostas fisiológicas internas. Por outro lado, carga interna representa as respostas fisiológicas efetivas que o atleta promove para se ajustar aos estímulos induzidos pela carga externa. Tanto frequência cardíaca como a concentração plasmática de lactato podem ser utilizados como indicadores para estimar a carga interna durante o exercício de corrida, por exemplo (Impellizzeri et al., 2019).

Evidências indicam que o gerenciamento inadequado da carga é um importante fator de risco para lesões (Soligard et al., 2016). Este tema tem tomado tal proporção, que, recentemente, o Comitê Olímpico Internacional convocou um grupo de especialistas para revisar a evidência científica da relação de carga de exercícios e as consequências na saúde dos indivíduos no esporte (Soligard et al., 2016).

Um conceito-chave a ser apreciado pelas equipes multidisciplinares responsáveis pela carga de exercício é que as adaptações inadequadas não são desencadeadas somente pelo gerenciamento inadequado das cargas de treinamento e competição, mas especialmente pela interação com estressores psicológicos não esportivos, como estresse por eventos negativos da vida e aborrecimentos diários, idade, sexo, esporte, condicionamento físico, saúde, fatores psicológicos, metabólicos e hormonais, os quais dificultam o gerenciamento de carga em atletas (Soligard et al., 2016).

Mudando seu bem-estar físico e psicológico, as cargas esportivas impostas aos atletas impõem estresse, que progride desde a homeostase do organismo até os estágios de fadiga aguda, FOR, NFOR e SOT (Soligard et al., 2016). Na condição de SOT, o atleta é forçado a interromper o treinamento ou até mesmo sua carreira atlética. Esta última, mais recentemente, foi denominada Síndrome do Desempenho Insuficiente sem Explicação, numa tradução literal da expressão, adotada no Reino

Unido, *unexplained underperformance syndrome* (UUPS). Esta terminologia reflete, segundo Lewis et al. (2018), sua complexidade e etiologia multifatorial.

O exercício físico extenuante é um estímulo importante para induzir intencionalmente adaptações musculares esqueléticas benéficas, como por exemplo, o aumento da força muscular e a hipertrofia (Cheng et al., 2020). Não obstante o fato de o exercício físico ser fundamental para estimular tais adaptações musculares, sabe-se que o período de recuperação pós-exercício é igualmente indispensável para prover o tempo hábil para que estas adaptações, tanto metabólicas, quanto estruturais, ocorram no organismo (Cheng et al., 2020). O ciclo exaustão-recuperação forma a principal base para a prescrição adequada de treinamento, com intuito de aumentar tanto a resistência quanto a força muscular (Cheng et al., 2020) **(Figura 1)**.



Figura 1. Diagrama demonstrando as etapas de um ciclo de treinamento e condicionamento físico (Fonte: O autor).

Tendo em vista o conflito de nomenclatura existente na literatura sobre SOT, sendo alguns de seus sinônimos encontrados na literatura: *burnout*, *staleness*, desempenho insuficiente e fadiga crônica (Carfagno e Hendrix, 2014). Na presente tese foi adotado o posicionamento do Colégio Europeu de Ciências do Esporte e do Colégio Americano de Ciências do Esporte (Meeusen et al., 2013), os quais caracterizaram *overtraining* (OT) como um processo contínuo de treinamento intensificado com possível indução do *overreaching* funcional (FOR) bem como *overreaching* não funcional (NFOR) e a SOT.

O FOR é caracterizado pela intensificação das sessões do treino, que provoca redução momentânea da aptidão física, sendo revertida pela prescrição de períodos adequados de recuperação provocando o efeito conhecido como "supercompensação", aumentando o condicionamento atlético (Aubry et al., 2015). Já o NFOR ocorre quando se intensifica as intensidades de esforço de maneira crônica, sem se respeitar o ciclo de treino-recuperação, acarretando numa redução persistente da aptidão física. Ao longo do tempo, a NFOR pode desencadear a SOT, estado clínico que pode ser classificado como "inadaptação prolongada" do atleta (Meeusen et al., 2013; Cheng et al., 2020), a qual possui etiologia multifatorial.

Sabendo que o treinamento desportivo visa principalmente a maximização do desempenho promovida por adaptações bioquímicas, musculares, neurológicas e comportamentais (Meeusen et al., 2013; Rohlf's et al., 2005), a FOR é considerada no meio esportivo uma estratégia para ganho posterior de aptidão física (Meeusen et al., 2013). Já o segundo, pode causar perda ou estagnação do condicionamento previamente adquirido, a qual está intimamente relacionado com o ciclo treino-recuperação (Meeusen et al., 2013; Dias, 2019).

De forma similar, a condição NFOR/SOT tem sido observada em atletas equinos, desencadeada principalmente por programas de treinamento mal conduzidos, aumento do número de competições, bem como exposição a longos períodos de transportes e mudanças ambientais (Graaf-roelfsema et al., 2007; McGowan e Whitworth, 2008). A diferenciação entre o estado NFOR e SOT é muito sutil e de difícil determinação, pois ambos comumente apresentam os mesmos sinais e sintomas, como alterações fisiológicas e psicológicas, estado catabólico acentuado, alterações imunológicas e bioquímicas, assim como aumento na incidência de lesões (Meeusen et al., 2013) **(Figura 2)**.

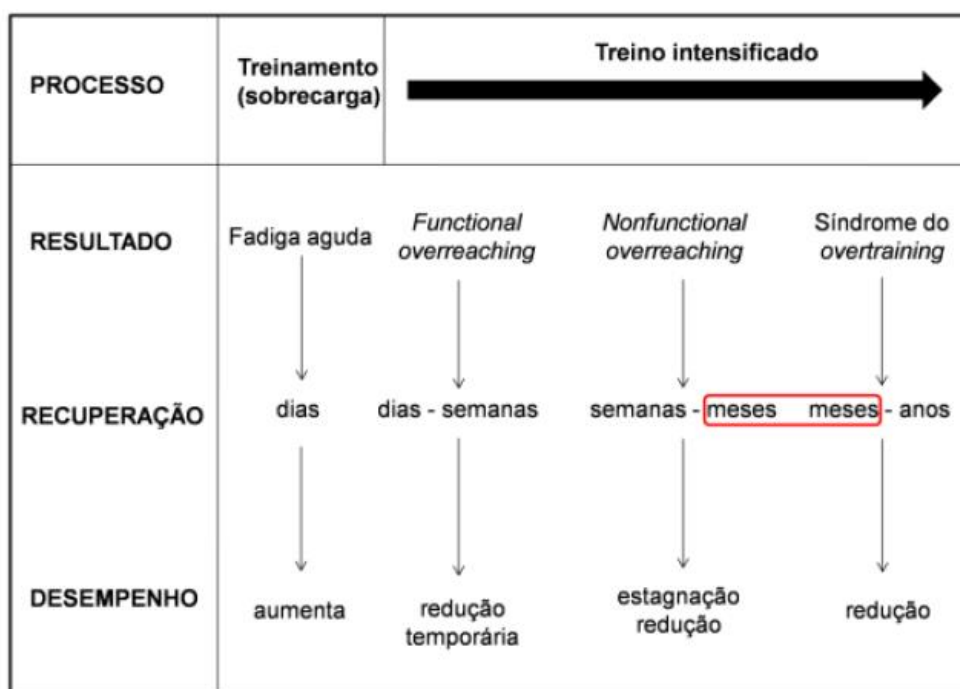


Figura 2. Possíveis resultados do treinamento, resultando em *overreaching* funcional, *overreaching* não funcional e síndrome do *overtraining* (Fonte: Adaptado de Meeusen et al., 2013).

É importante evidenciar que a NFOR/SOT pode ter implicações devastadoras na carreira de um atleta (Cheng et al., 2020), devendo esta condição ser evitada, visto a gravidade dos sintomas (Haaf et al., 2019). A prevalência de NFOR/SOT é elevada em atletas humanos e em equinos, variando sua incidência de acordo com a modalidade esportiva.

No meio esportivo, não raro, a redução no desempenho é confundida com insuficiência de estímulos, e leva, de maneira equivocada, ao aumento da carga de exercícios, e redução dos períodos de recuperação dos atletas por parte dos treinadores, o que os torna mais susceptíveis a desenvolver a NFOR/SOT (Ferraresso, 2012).

Em humanos, alguns sintomas que são comumente associados às condições NFOR/SOT podem ser observados na **Tabela 1**. Carfagno e Hendrix (2014) salientaram que os estudos sobre a incidência e prevalência da SOT são limitados e conflitantes, indicando que entre 5% e 64% dos atletas de elite vivenciam episódios de SOT pelo menos uma vez durante suas carreiras, sendo que até o presente

momento, nenhum teste/biomarcador que seja confiável e específico para prevenção e diagnóstico desta condição, foi identificado (Cadegiane e Kater, 2019).

Tabela 1. Sinais e sintomas relacionados à NFOR/SOT

Fisiológicos	Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca; frequência respiratória aumentada; consumo de O ₂ aumentado em exercício submáximo; fadiga crônica; taxa metabólica aumentada; redução de desempenho; recuperação prolongada; tolerância reduzida ao treinamento; redução da força muscular; redução da capacidade máxima de trabalho; perda de coordenação motora; náusea; dores de cabeça; inapetência; distúrbios gastrintestinais.
Psicológicos e comportamentais	Fadiga mental; redução de apetite; distúrbios do sono; depressão; apatia geral; baixa autoestima; instabilidade emocional; medo da competição; dificuldade de concentração; mudanças na personalidade; aumento da distração; irritabilidade.
Metabólicos, neuroendócrinos e bioquímicos	Proteína C-reativa elevada; creatina quinase elevada; balanço negativo de nitrogênio; redução das concentrações de lactato após testes máximos e submáximo (paradoxo); aumento na concentração de uréia; aumento na concentração de ácido úrico; disfunção hipotalâmica; redução nas concentrações de glicogênio muscular; hemoglobina diminuída; redução da testosterona livre; aumento nas concentrações de cortisol; diminuição da glutamina plasmática; queda de peso; diminuição da excreção urinária de catecolaminas.
Hematológicos e imunológicos	Aumento na susceptibilidade em contrair resfriados e alergias; redução da atividade dos neutrófilos; diminuição da contagem de linfócitos totais; aumento da contagem de eosinófilos no sangue; diminuição das concentrações de hemoglobina, ferro sérico e ferritina.

FONTE: Alves e Costa; Samulsky, 2006; Graaf-roelfsema et al., 2007; McGowan e Whitworth, 2008.

O interesse da comunidade científica, aliado à escassez de métodos específicos e sensíveis para o diagnóstico da SOT, evidência a necessidade do

desenvolvimento de pesquisas nessa área, pois identificar marcadores que se correlacionam com a NFOR/SOT pode interromper a progressão de um ciclo potencialmente negativo (Carfagno e Hendrix, 2014). Ademais, ainda hoje não se têm conhecimento técnico-científico da prescrição ideal dos períodos de recuperação para alcançar a adaptação “ideal” da musculatura (Cheng et al., 2020). Portanto, comumente, atletas de alto rendimento têm dificuldades para conciliar a recuperação entre suas sessões de treinos e competições.

Dentro deste contexto, visando auxiliar na busca por marcadores e desvendar as possíveis causas subjacentes da NFOR/SOT, buscamos avaliar na presente pesquisa se essas condições seriam capazes de causar alterações nas concentrações de glicogênio muscular ou hepático, na atividade enzimática da citrato sintase, nas concentrações glicose e lactato e se poderiam modular a quantidade dos MCT1 e MCT4. Avaliamos também o comportamento frente a estas condições em ratos Wistar bem como alguns índices somáticos.

2.2. Citrato sintase

O exercício físico ser considerado um estímulo estressor para o organismo, já é uma afirmação bem consolidada na literatura. Tal estímulo provoca distúrbios na homeostase geral, em especial dos músculos esqueléticos, desencadeando uma “cascata de reações”, à exemplo a secreção de hormônios e enzimas catabólicas como a citrato sintase (CS) e estimulação das vias metabólicas produtoras de energia (Burchfield, 1979; Morton et al., 2009), tanto aeróbias (oxidativas), quanto anaeróbias (glicolíticas).

Inúmeras alterações nas células musculares esqueléticas ocorrem devido ao treinamento de resistência, como por exemplo na glicólise, ciclo de Krebs, cadeia respiratória assim como na atividade enzimática. Estas alterações provocam aumento do metabolismo oxidativo, contribuindo para melhora do desempenho do atleta (Zoppi e Macedo, 2008).

A CS é uma das enzimas que compõe a matriz mitocondrial, sendo caracterizada como um marcador da capacidade oxidativa mitocondrial muscular

(Dias, 2019). Sabe-se que a CS muscular pode sofrer alterações em sua atividade, de forma aguda, após uma única sessão de treinamento de resistência (Leek et al., 2001). Estudos distintos, desempenhados tanto com atletas humanos quanto em modelos animais, têm demonstrado associação entre treinamento excessivo e baixa atividade da CS.

Pesquisas prévias, utilizando o protocolo de *overtraining* desenvolvido e caracterizado por Hohl e colaboradores (2009) observaram menor atividade da CS no músculo gastrocnêmio vermelho (GV) em ratos Wistar que manifestaram desempenho reduzido de longo prazo. Este fenômeno foi considerado indicativo de atividade da respiração mitocondrial reduzida, sugerindo que a diminuição da atividade da CS pode contribuir efetivamente para redução do desempenho muscular na condição NFOR/SOT (Cheng et al., 2020).

Em contrapartida, estudo realizado com modelo animal, relatou aumento na atividade da CS em ratos treinados, sendo este fenômeno considerado como uma adaptação positiva ao protocolo de condicionamento, considerando a CS como marcador da capacidade oxidativa (Ferraresso et al., 2012). Leek e colaboradores (2001), observaram em atletas humanos, logo após uma sessão de treino executado em ergômetro de extensão de joelhos, ocorreu uma elevação na atividade da CS do músculo vasto lateral (VL), a qual perdurou 24 horas.

2.3. Glicogênio muscular e hepático

Segundo Lewis et al. (2018), a complexidade da SOT, que possui etiologia multifatorial, não ocorre somente devido ao desequilíbrio entre a intensificação do treino e a recuperação, não sendo este considerado o agente causal primário da redução da performance. Estudos têm sugerido diversas hipóteses para explicar as causas intramusculares subjacentes do NFOR/SOT, sendo uma das propostas a depleção de glicogênio. Esta hipótese estabelece que a redução nas concentrações de glicogênio provocadas pelo exercício está intimamente relacionada com a queda no desempenho atlético (Kirwan, 1988).

As inúmeras adaptações causadas pela atividade física variam, desde as facilmente perceptíveis, como aumento no desempenho e hipertrofia muscular, bem como as “microadaptações”, como a angiogênese e biogênese mitocondrial (Cheng et al., 2020).

Tendo por função primordial o armazenamento de energia, o polímero multi-ramificado conhecido como glicogênio é encontrado em diversos tecidos, mas em concentrações maiores nos músculos esqueléticos, especialmente nos músculos tipo II (glicolíticos), bem como no fígado (Cheng et al., 2020).

As elevadas concentrações de glicogênio no músculo esquelético demonstram sua relevante função no que se diz respeito ao fornecimento rápido de adenosina trifosfato (ATP) às células musculares, que exibem alta e rápida mudança de necessidade energética (Ortenblad e Nielsen, 2015). Sendo assim, estudos propõem que a redução do conteúdo de glicogênio intramuscular pode participar consideravelmente no desencadeamento da fadiga. Esta redução prejudicaria significativamente a recuperação (Cheng et al., 2017) devido à redução da capacidade de síntese celular de ATP, visto que a gliconeogênese muscular é lenta (Zoppi e Macedo, 2008; Krstrup, 2011), favorecendo instalação de fadiga precoce durante o exercício de endurance (Zoppi e Macedo, 2008).

Contudo, tratando-se de uma síndrome multifatorial, fica evidente que o conteúdo de glicogênio muscular avaliado de maneira isolada não é capaz de explicar o mecanismo do NFOR/SOT (Cheng et al., 2020).

2.4. Corticosterona

A corticosterona é um glicocorticoide liberado pelo córtex das glândulas adrenais de roedores, répteis e anfíbios. Nos humanos o hormônio equivalente a corticosterona é o cortisol. Este desempenha um importante papel em relação a regulação da ansiedade (Champagne et al., 2008).

A estimulação do eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA) inicia com a excitação do hipotálamo por diferentes estressores. Estes estímulos ativam todo o

sistema para promover a rápida liberação de cortisol, que por sua vez, desencadeia uma série de efeitos metabólicos direcionados com intuito de amenizar a natureza desfavorável do estado estressante (Graaf- roelfsema et al., 2007).

A NFOR/SOT representa a tentativa do organismo de lidar com estressores fisiológicos (Meeusen et al., 2013). O exercício bem como o treinamento físico são estressores que induzem a secreção tanto basal quanto estimulada de cortisol em inúmeras espécies (Rivero et al., 2008), incluindo equinos (Graaf- roelfsema et al., 2007). Simultaneamente ao aparecimento de um "transtorno de estresse", o sistema endócrino é recrutado para neutralizar a situação (Meeusen et al., 2013). A adrenalina, noradrenalina e cortisol, produtos hormonais primários, tem por função redistribuir os "combustíveis" metabólicos, aumentar a capacidade de resposta do sistema cardiovascular bem como manter a glicose no sangue (Meeusen et al., 2013).

Sabe-se que a estimulação crônica do eixo HHA pode ocasionar o aumento nas concentrações de cortisol em humanos e de corticosterona nos roedores. Em elevadas concentrações, esses hormônios que podem despertar inúmeras respostas indesejadas ao organismo, como diminuição da resposta imunológica e resistência à insulina (Rivero et al., 2008), bem como o surgimento de psicopatologias, como depressão e ansiedade (De Kloet et al., 2008).

Por vários anos, foi levantada a hipótese de que uma desregulação central mediada por hormônios ocorre durante as condições de NFOR/SOT, e que avaliações dos hormônios poderiam ajudar a detectar a NFOR/SOT (Meeusen et al., 2013), sendo uma disfunção do eixo hipotálamo hipófise adrenal foi sugerida como a causa para o desencadeamento de NFOR/SOT (Graaf- roelfsema et al., 2007; Rivero et al., 2008; Meeusen et al., 2013). Barron et al. (1985), descreveram em atletas humanos uma disfunção HHA na SOT, relataram diminuição na resposta do cortisol à hipoglicemia induzida.

A maioria dos estudos de exercícios conclui que tanto os exercícios de alta intensidade quanto os de endurance causam elevação nas concentrações de ACTH plasmático e no cortisol em atletas humanos (Graaf- roelfsema et al., 2007). Por via de regra, o exercício de alta intensidade, tanto para humanos quanto para cavalos, resulta em aumento de 2 a 3 vezes no cortisol, retornando as concentrações pré-exercício dentro de uma hora (Graaf- Roelfsema et al., 2007).

Dentro deste contexto, respostas hormonais prejudicadas a testes estressantes induzidos por exercícios máximos foram relatadas dentre alguns biomarcadores propostos para o diagnóstico da NFOR/SOT (Cadegiane e Kater, 2019). Em uma revisão sistemática, Carfagno e Hendrix (2014) confirmaram que as respostas hormonais aos exercícios intensos parecem ser mais adequadas para avaliar o NFOR/SOT.

Estudo em que ratos foram submetidos à exercícios de natação e corrida em esteira demonstrou aumentos significativos nas concentrações de corticosterona quando comparados aos animais em repouso (Contarteze et al., 2007). Com relação a NFOR/SOT, um artigo de revisão que comparou humanos com equinos, revelou que exercícios de alta intensidade ou resistência causam aumento tanto ACTH quanto de cortisol em ambas espécies (Graaf-roelfsema et al., 2007).

É importante ressaltar que existe grande divergência de resultados na literatura em relação as alterações nas concentrações de cortisol e a condição NFOR/SOT (Kreher e Schwartz, 2012). Alguns autores não verificaram alteração na concentração plasmática basal de cortisol em atletas em OT (Hooper et al., 1993; Urhausen et al., 1998). Outros estudos observaram aumento (Barron et al., 1985; Adlercreutz et al., 1986) e até mesmo diminuição (Lehmann et al., 1992). No entanto, nem sempre são observados aumentos nas concentrações séricas desse hormônio na condição NFOR/SOT (Carfagno e Hendrix, 2014).

2.5. Aspectos comportamentais

As relações entre as alterações psicológicas, o rendimento esportivo e a monitorização do treinamento têm sido motivo de preocupações e, consequentemente, de investigações na área da psicologia do esporte (Freitas et al., 2009). Sendo assim, durante a última década, a recuperação física e mental no esporte tem recebido atenção especial e crescente tanto na pesquisa e quanto na prática (Kellmann, 2010). Para evitar NFOR/SOT, recuperação fisiológica e psicológica deve ser parte integrante do plano de treinamento (Kellmann, 2010).

Há muito tempo a presença de sintomas psicológicos em casos de NFOR/SOT tem sido identificada (Meeusen et al, 2013). Contudo, estudos sistemáticos só começaram após o pesquisador William Morgan, em 1980, desenvolver uma pesquisa com nadadores universitários por meio de questionários de perfil de estados de humor (POMS - "Profile of Mood States"), que tem por finalidade avaliar as alterações comportamentais gerais e específicas (Meeusen et al., 2013).

Usando o POMS, os atletas relataram, durante os períodos de treinamento rigoroso, elevações no humor negativo como tensão, depressão, raiva, fadiga e confusão e reduções no humor positivo (Meeusen et al., 2013). Apenas 2 dias de treinamento intensificado podem resultar em aumentos significativos nas medidas de POMS, que muitas vezes precedem alterações em marcadores de estresse de treinamento, como o cortisol (Meeusen et al, 2013)

Na tentativa de analisar os efeitos das cargas de treino, a avaliação psicológica tem sido muito utilizada (Kellmann, 2002), sendo hoje considerada um dos métodos mais eficazes e não invasivos para detecção e prevenção da condição NFOR/SOT em atletas humanos, realizada em conjunto com registros de desempenho e alterações hormonais (Morgan et al., 1987; Rietjens et al., 2005; Graaf-roelfsema et al., 2007). Segundo Freitas et al. (2009), estudos que tem demonstrado relação entre o exercício e a condição psicológica concluíram que o exercício intenso afeta de maneira negativa o estado de humor.

Uma variedade de sintomas clínicos é tipicamente observada na NFOR/SOT, incluindo sintomas psicológicos como, distúrbios nos ciclos de sono e vigília, diminuição do apetite, humor deprimido, apatia geral, redução da autoestima, instabilidade emocional, inquietação, irritabilidade, estresse e ansiedade, redução da motivação, diminuição do foco e concentração dentre outras variações de humor (Kellmann, 2010; Myrick, 2015). Além da busca por biomarcadores fisiológicos, muitos outros estudos correlacionaram mudanças nos perfis psicológicos com os estados NFOR / OTS (Myrick, 2015).

Equinos podem apresentar modificações comportamentais relacionados ao excesso de treinamento. Observaram queda de desempenho acompanhada por sintomas como falta de vontade de iniciar sessões, nervosismo, irritabilidade, sendo que estes animais se tornaram mais difíceis de lidar (Mcgowan e Whitworth, 2008;

Rivero et al., 2008), revelando distúrbios comportamentais semelhantes aos encontrados em humanos.

Vale ressaltar que os marcadores psicológicos têm sido amplamente utilizados na tentativa de avaliar os efeitos das cargas de treino (Freitas et al., 2009). Outros métodos além do Perfil de Estado de Humor (POMS), como o Questionário de Estresse- Recuperação (REST-Q), Escala de Percepção do esforço de Borg (RPE) têm sido adotados para o monitoramento dos treinamentos (Freitas et al., 2009). Estudos envolvendo roedores submetidos a protocolos de indução das condições FOR e NFOR/SOT previamente definidos e distúrbios comportamentais não foram encontrados na literatura analisada.

2.6. Lactato

Há muito tempo que o lactato é considerado um mero produto residual do metabolismo celular. Durante os últimos anos, foi descoberto que o lactato pode atuar como substrato energético para a musculatura esquelética (Bergersen, 2007). A literatura recente revelou que possivelmente os neurônios também podem utilizar este metabólito para produção de energia e como neurotransmissor (Proia et al., 2016). O lactato também é considerado importante molécula sinalizadora, que contribui para vários processos homeostáticos (Magistretti e Allaman, 2018). Alguns papéis emergentes do lactato na função cerebral são na modulação da excitabilidade neuronal, plasticidade neuronal e neuroproteção (Magistretti e Allaman, 2018).

Quantitativamente considerado o monocarboxilato mais importante, o lactato é o produto da glicólise anaeróbia, processo que a glicose é clivada enzimaticamente à piruvato, que por sua vez pode entrar na mitocôndria para ser oxidado no ciclo de Krebs ou pode ser convertido a lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (Bergersen, 2007). Possuindo pKa 3.9, o ácido láctico existe quase que inteiramente na forma de ânion lactato em pH fisiológico (Bergersen, 2007).

Considerando a significância da via da glicólise anaeróbia, sabe-se que o músculo esquelético é considerado o principal produtor de lactato no organismo (Bergersen, 2007). Durante o exercício de baixa intensidade, o metabolismo muscular produz energia (ATP) predominantemente pela via aeróbia, a partir da contração de

fibras oxidativas, tipo I. A demanda por energia aumenta em conjunto com o aumento da intensidade do exercício. Sendo assim, a participação da via anaeróbia torna-se fundamental para que o atleta atinja altas velocidades, ocorrendo mobilização de fibras musculares conhecidas como glicolíticas, tipo II (Carvalho et al., 2005). Dependendo da aptidão física do atleta, nesta fase ocorre acúmulo de lactato sanguíneo, indicando maior contribuição do metabolismo anaeróbio para produção de ATP (Carvalho et al., 2005).

Dentre os marcadores bioquímicos das condições NFOR/SOT, os mais citados são a glutamina plasmática, a atividade da creatina quinase, uréia e o lactato sanguíneo (Cunha et al., 2006). O lactato é um metabólito produzido constantemente em repouso por diversos tecidos do corpo incluindo o músculo, este é produzido principalmente durante o exercício predominantemente anaeróbio (Araújo et al., 2008). Portanto, a análise desse metabólito em conjunto com outros parâmetros tem se mostrado um bom indicador de esforço anaeróbio, o que permite sua utilização como um marcador da NFOR/SOT durante o treinamento (Bosquet et al., 2001; Bonifazi et al., 2000).

Um achado consistente mostra que atletas de força e resistência com NFOR/SOT reduziram a concentração máxima de lactato, enquanto as concentrações submáximas continuaram dentro dos limites normais (Carfagno e Hendrix, 2014). Outros estudos demonstraram que indivíduos que apresentaram *overtraining* e *overreaching* obtiveram reduções nas concentrações de lactato em teste incremental quando comparados ao controle (Bosquet et al., 2001). Em cavalos em *overtraining*, diferentemente do que é observado em humanos, foi observado aumento das concentrações de lactato após testes máximos e submáximos (Hamlin et al., 2002).

Uma das dificuldades existentes é que tanto o condicionamento como o NFOR/SOT promovem deslocamento da curva do lactato para a direita (Cunha et al., 2006), evento comumente associado à melhoria na aptidão física. No NFOR/SOT esse deslocamento está relacionado ao "paradoxo do lactato" (Graaf-roefselma et al., 2007), o qual é caracterizado pelo deslocamento da curva devido à redução nas reservas de glicogênio. Por ser uma técnica acessível e bastante utilizada no meio esportivo, o controle do lactato pode ser uma ferramenta viável na prevenção do NFOR/SOT (Cunha et al., 2006).

2.7. Transportadores monocarboxilatos MCT1 e MCT4 e proteína auxiliar CD147

Nos músculos, a concentração de lactato é o resultado do seu fluxo dentro e fora das células (Nikooie et al., 2013). Nas células dos mamíferos, o transporte de ácidos monocarboxílicos através da membrana plasmática é essencial. A principal via para este transporte é mediada pela família de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), descrita há mais de trinta anos por Brooks (Juel e Halestrap, 1999; Nikooie et al., 2013; Proia et al., 2016). O transporte é predominantemente passivo e estes transportadores, localizados na membrana plasmática, podem funcionar de maneira bidirecional, de acordo com o gradiente de concentração de seus substratos (Payen et al., 2020)

Durante o exercício, o metabolismo anaeróbio produz íons lactato e H^+ , que possuem grande potencial como fonte de energia. Estes metabólitos são removidos do meio intracelular através dos MCTs (Takimoto et al., 2013), essenciais para o controle da acidose muscular (Frollini et al., 2008).

Existem 14 isoformas de MCTs identificadas até o presente momento. As duas isoformas mais comumente encontradas nos músculos esqueléticos são MCT1 e MCT4 (Nikooie et al., 2013). Estudos demonstraram que a proteína CD147, uma glicoproteína transmembranar da superfamília das imunoglobulinas, é necessária para que ocorra a expressão normal de MCT1 e MCT4 (Halestrap, 2012). Vale ressaltar que os membros MCT1, MCT2, MCT3 e MCT4 transportam íons de monocarboxilato em conjunto com prótons, como demonstra a **Figura 3**.

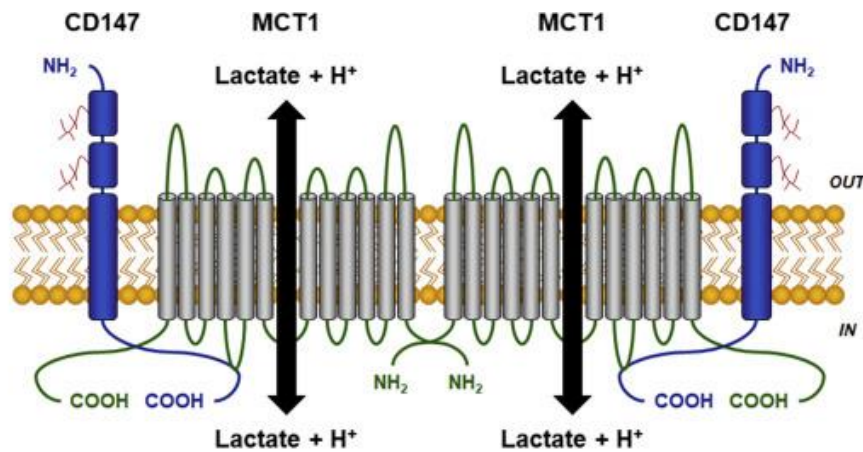


Figura 3. Transportes realizados pelos MCT1-4. A figura demonstra a estrutura do MCT1 interagindo com a proteína auxiliar CD147 na membrana celular (Fonte: Payen et al. 2020).

Em humanos e ratos, a isoforma MCT1 é principalmente expressa nas fibras oxidativas (Tipo I). Esta isoforma é responsável pelo influxo de lactato nestas fibras (Mikkänen, 2011), realizando o transporte de lactato pelo sarcolema e mitocôndria. Desta maneira, torna-se responsável pela retirada do lactato sistêmico.

Já a isoforma MCT4, que possui menor afinidade para o lactato dentre a família dos MCTs, se expressa principalmente em fibras glicolíticas (Tipo II), sendo responsável pela remoção/efluxo do lactato do músculo (Mikkänen, 2011; Proia et al., 2016, Payen et al, 2020).

Em alguns tecidos os MCTs facilitam as trocas de lactato entre as células produtoras e consumidoras. Um exemplo são as conhecidas fibras musculares brancas glicolíticas presentes nos músculos esqueléticos, que expressam MCT4, o qual fornece lactato às fibras musculares vermelhas oxidativas que expressam MCT1 (Payen et al 2020).

A expressão dos MCTs é regulada por diversos estímulos. O exercício físico e hipóxia aumentam sua expressão, ao passo que a desnervação e a hiperlactatemia têm um efeito negativo (Nikooie et al., 2013). Neste âmbito, o condicionamento físico de alta intensidade provoca, em humanos e equinos, aumento da expressão de MCT1, MCT4 e CD147 no músculo esquelético (Kitaoka et al., 2011), o que favorece a regulação do pH e a manutenção da contração muscular. Estudo com ratos investigou

o efeito do treinamento não periodizado realizado a 80, 100 e 120% da intensidade do limiar anaeróbio e um modelo de treinamento periodizado linear na expressão gênica dos transportadores de MCT1 e 4 demonstrou apenas expressões de MCT1 no músculo foram alteradas por diferentes regimes de treinamento, com mRNA de MCT1 aumentando em ratos treinados em intensidades mais baixas (G80), e o conteúdo de proteína MCT1 mostrou valores mais altos em grupos não periodizados em comparação com o pré-treinamento e GPE (Forte et al., 2020). Entretanto, o papel fisiológico das diferentes intensidades e volumes de exercício relacionados à expressão dessas proteínas no músculo esquelético necessita estudos adicionais (Frollini et al., 2008).

3. OBJETIVO GERAL

Pensando na lacuna existente na literatura no que se refere a protocolos de avaliação e diagnóstico do NFOR/SOT, o propósito da presente Tese foi auxiliar a compreender as possíveis alterações comportamentais, bioquímicas, marcadores musculares e transportadores de monocarboxilatos que podem contribuir para o desencadeamento da condição NFOR/SOT induzido pelo desequilíbrio entre carga externa e períodos de recuperação.

3.1. Objetivos específicos

- ❖ Induzir as condições FOR e NFOR por meio da utilização de um protocolo de *overtraining* e avaliar o desempenho dos ratos por meio de testes máximos de performance;
- ❖ Investigar se as condições FOR e NFOR foram capazes de provocar alterações significativas na capacidade oxidativa do músculo gastrocnêmio vermelho por meio da atividade enzimática da citrato sintase;
- ❖ Investigar se as condições FOR e NFOR foram capazes de provocar alterações significativas no conteúdo de glicogênio muscular e hepático dos animais;
- ❖ Investigar se as condições FOR e NFOR foram capazes de provocar alterações significativas no comportamento;
- ❖ Considerando que o NFOR/SOT é capaz de modificar as concentrações de lactato e que a atividade física pode modular a expressão dos MCTs, objetivou-se investigar se a alteração no lactato possivelmente causada por esta condição está relacionada com modificações na expressão destes transportadores presentes no músculo esquelético de ratos Wistar;

- ❖ Investigar o uso do modelo de componentes principais para identificação da separação de grupos FOR e NFOR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e manejo

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), Jaboticabal/SP-Brasil (nº 23593/15). Inicialmente foram utilizados 100 ratos Wistar machos, massa corporal (MC) entre 150 e 200 g, fornecidos pelo Biotério Central do Câmpus de Botucatu – UNESP, que foram alojados no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício Equino e Farmacologia (LAFEQ) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV-UNESP). Os ratos foram mantidos em ciclo de claro-escuro invertido 12:12 h, sendo o período com luz das 18:00 - 6:00 h, e temperatura ambiente de aproximadamente 23°C, alojados em caixas de polietilpropileno (34 x 41 x 18 cm) providas de cama de maravalha, sendo quatro ratos por caixa. Ração (Presence® - Roedores, Ratos e Camundongos) e água foram fornecidos *ad libitum*

4.1.1. Composição básica da ração Presence®

Composição básica: Milho integral moído, farelo de soja, soja integral desativada, farelo de trigo, farinha de trigo, farelo de arroz, arroz quebrado, farinha de carne, farinha de peixe, fosfato bicálcico, calcáreo calcítico, cloreto de sódio (sal comum), sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, lisina, metionina, ureia formaldeído, ácido propiônico, ácido acético, propionato de amônio. Espécies

doadoras do gene: “*Agrobacterium tumefaciens* e/ou *Arabidopsis thaliana* e/ou *Bacillus thuringiensis* e/ou *Streptomyces hygroscopicus* e/ou *Streptomyces viridochromogenes* e/ou *Zea mays*.”

Níveis de garantia: Umidade (máx.) 130,00 g/kg; proteína bruta (min.) 230,00 g/kg; extrato etéreo (min.) 45,00 g/kg; fibra bruta (máx.) 50,00 g/kg; matéria mineral (máx.) 100,00 g/kg; cálcio (min.) 12,00 g/kg; cálcio (máx.) 13 g/kg; fósforo (min.) 8.500,00 mg/kg; flúor (máx.) 30,00 mg/kg; sódio (min.) 2.800,00 mg/kg; ferro (min.) 180,00 mg/kg; cobre (min.) 30,00 mg/kg; manganês (min.) 110,00 mg/kg; zinco (mn.) 110,00 mg/kg; iodo (min.) 1,00 mg/kg; cobalto (min.) 2,00 mg/kg; selênio (min.) 0.20 mg/kg; vitamina A (min.) 25.500,00 UI/kg; vitamina D3 (min.) 4.000,00 UI/kg; vitamina E (min.) 82,00 UI/kg; vitamina K3 (min.) 6,40 mg/kg; vitamina B1 (min.) 11,00 mg/kg; vitamina B12 (min.) 12,00 mg/kg; niacina (min.) 219,00 mg/kg; ácido pantotênico (min.) 90,00 mg/kg; vitamina B6 (min.) 11,00 mg/kg; ácido fólico (min.) 13,00 mg/kg; biotina (min.) 0,16 mg/kg; vitamina B12 (min.) 40,00 mcg/kg; colina (min.) 2.800,00 mg/kg; lisina (min.) 12,50 g/kg; metionina (min.) 3.500,00 mg/kg.

4.2. Protocolo de *overtraining* (PO)

Os ratos foram adaptados à esteira pelo período de três semanas, fase utilizada para avaliar e separar os animais que correram voluntariamente. Após o período de adaptação foram excluídos 25 ratos, que se recusaram a correr voluntariamente na esteira (**Figura 4**). O protocolo de indução de *overtraining* (PO) foi baseado num programa contínuo de treinamento com desequilíbrio entre o estímulo do exercício e períodos de recuperação (Hohl et al., 2009). Tal protocolo foi constituído de 12 semanas de treinamento distribuídas em 5 fases (F1 a F5). Realizaram-se 2 fases iniciais (Fase 1 e 2) até a oitava semana de treinamento. Ato contínuo, 3 fases foram realizadas (3, 4 e 5), em que foi elevada a intensidade de treino e reduzido o tempo de recuperação entre as sessões, com intuito de causar desequilíbrio no ciclo treino-recuperação, conforme a **Tabela 2**. Ademais, adicionou-se duas semanas de recuperação passiva após o final do PO.



Figura 4. Imagem da esteira motorizada para roedores (AVS®) utilizada para desenvolvimento do protocolo de treinamento (Fonte: Arquivo pessoal).

Tabela 2. Protocolo utilizado durante o programa de condicionamento de ratos Wistar para o desenvolvimento da NFOR/SOT (adaptado de Hohl et al., 2009).

FASES DO PROTOCOLO	SEMANAS	HORA DE EXECUÇÃO	VELOCIDADE (m.min ⁻¹)	TEMPO (min)	FREQUÊNCIA (sessões diárias)	RECUPERAÇÃO (horas)
ADAPTAÇÃO	1 ^a	13:00-17:00	12	10	1x	24
	2 ^a	13:00-17:00	12	10	1x	24
	3 ^a	13:00-17:00	12	10	1x	24
FASE 1	1 ^a	13:00-17:00	15	20	1x	24
	2 ^a	13:00-17:00	20	30	1x	24
	3 ^a	13:00-17:00	23	45	1x	24
	4 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
FASE 2	5 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
	6 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
	7 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
	8 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
FASE 3	9 ^a	6:00-18:00	25	60	2x	4
FASE 4	10 ^a	6:00-18:00	25	60	3x	3
FASE 5	11 ^a	6:00-18:00	25	60	4x	2
	12 ^a	6:00-18:00	25	60	4x	2
RP 1	1 ^a	Fim do PO - sem treino				
RP 2	2 ^a	Fim do PO - sem treino				

RP, Recuperação passiva; PO, Protocolo de *overtraining*

4.3. Testes máximos de performance (TMP)

Aplicaram-se 9 testes máximos de performance (TMP) para avaliação do desempenho dos ratos. Esses foram realizados 60 h após a última sessão de treino semanal, sendo que os ratos retornaram às suas atividades após 48 h de recuperação. Os testes iniciaram à velocidade de 12 m.min⁻¹, que foi incrementada 1 m.min⁻¹ a cada 2 min, até que a velocidade de 20 m.min⁻¹ fosse atingida. Ato contínuo, incrementou-se a velocidade em 2 m.min⁻¹ a cada 3 min (Hohl et al., 2009) (**Figura 5**). Este acréscimo foi mantido até que os ratos atingissem a exaustão, determinada quando eles tocassem a grade de estímulo elétrico 5 vezes durante período de 1 min. Todos os ratos foram pesados imediatamente antes aos TMP's, sendo que os pesos corpóreos (PC) foram utilizados para o cálculo do desempenho.

O TMP-1 foi realizado após a semana de adaptação em esteira, sendo que os ratos que obtiverem desempenho entre 70 e 230 kg.m (Hohl et al., 2009), foram selecionados para iniciar o PO (**Figura 6**).

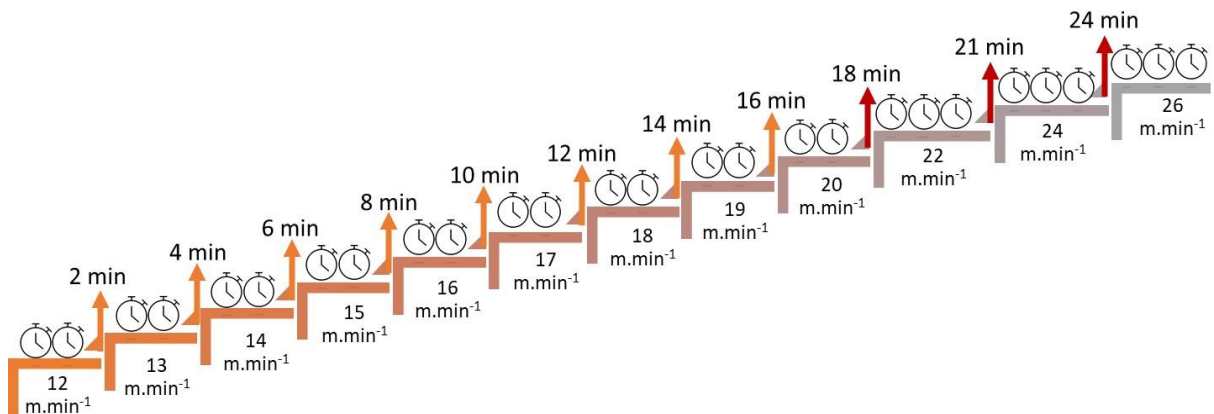


Figura 5. Representação de um teste máximo de performance (TMP) com incrementos no tempo e velocidade em esteira (Fonte: O autor).

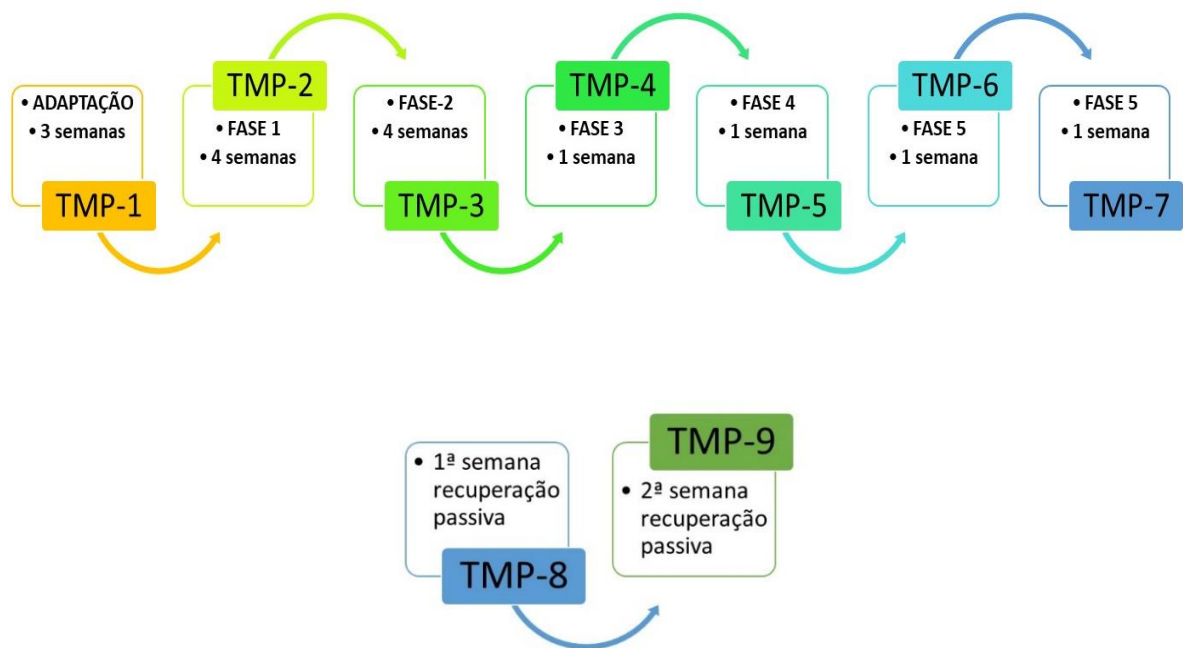


Figura 6. Diagrama demonstrando o momento em que cada um dos nove testes de performance máximos aplicados (TMP) foram realizados durante o protocolo de *overtraining* (PO) (Fonte: O autor).

4.4. Quantificação da do desempenho individual

O desempenho foi expresso em quilogramas-metros (kg.m) e foi determinado por meio do modelo massa-dependente previamente definido (Hohl et al., 2009). Tal procedimento considera todas as forças relativas ao PC e as velocidades proporcionais à intensidade de esforço (velocidade de corrida) atingida pelo rato em cada etapa do TMP. Desta maneira, a potência mecânica torna-se proporcional à massa do rato vs. velocidade percorrida em cada etapa, como exemplificado na seguinte equação:

$$D = \sum D_i = \sum m \cdot V_i \cdot T_i = \sum m \cdot dt_i = m \cdot dt$$

Onde: D=desempenho do rato; D_i =desempenho do rato em cada etapa do teste máximo de performance; m=massa do corpo; V_i =velocidade da fase; T_i =duração de corrida da fase; dt_i =distância percorrida na fase; dt=distância total percorrida pelo rato durante o teste.

4.5. Distinção do grupo treinado em FOR e NFOR

A partir dos resultados obtidos no TMP-1, de acordo com Hohl et al. (2009), os ratos que obtiveram desempenho ente 70 e 230 kg.m foram selecionados para participar do PO. Dos ratos selecionados, dezesseis foram utilizados como grupo ativo (AT) e foram submetidos a um condicionamento leve (1 sessão/d / 2x/semana / 12 m.min⁻¹). Os ratos remanescentes compuseram inicialmente o grupo treinado (TR) que participaram do PO. Para verificar se o desempenho dos ratos do grupo TR reduziu ou não e redistribuí-los em grupos FOR e NFOR, após o TMP-7 quantificamos o grau de inclinação (α) obtido a partir de uma função linear ($y = ax + b$) por meio da regressão linear dos mínimos quadrados dos desempenhos (D) nos testes TMP-2, 3, 4, 5, 6 e 7.

O valor da inclinação crítica para a separação de grupos foi estabelecido a partir do valor médio do α dos indivíduos que compuseram o grupo AT menos 1 DP (Hohl

et al., 2009). O resultado deste procedimento foi plotado em forma de histograma na **Figura 7**, demonstrando a distribuição de todos os ratos que realizaram o PO, de acordo com α crítico. Esta distribuição dividiu os ratos em dois grupos (FOR e NFOR), sendo que ratos que obtiveram α menor do que o do grupo AT foram classificados como NFOR e ratos com α maior que o do grupo AT como FOR (**Figura 8**).

Imediatamente após TMP-7, oito ratos de cada grupo (AT, FOR e NFOR) foram submetidos à eutanásia, para obtenção de amostras de sangue e tecidos. O ratos remanescentes passaram por duas semanas de recuperação passiva e foram submetidoa à eutanásia para obtenção de amostras de sangue e tecidos logo após o TMP-9 (**Figura 9**).

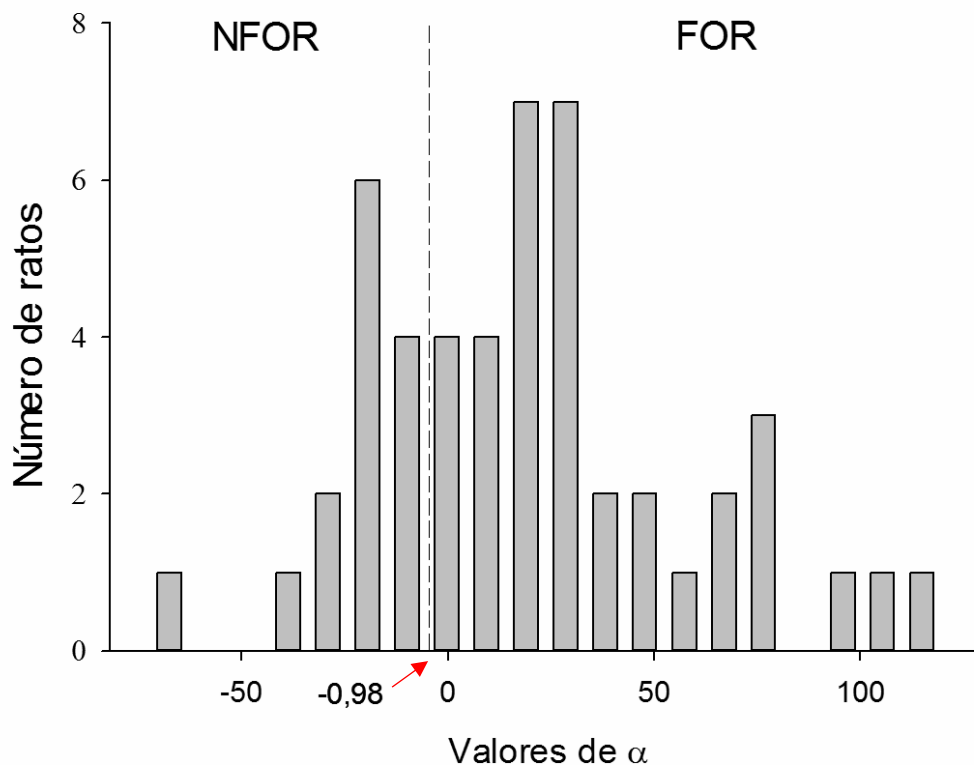


Figura 7. Histograma de distribuição dos grupos de ratos Wistar machos após TMP-7; NFOR, *overreaching* não funcional (n=14); FOR, *overreaching* funcional (n=19). Seta vermelha: indica o α crítico de -0,98 kg.m utilizado para classificação dos grupos.

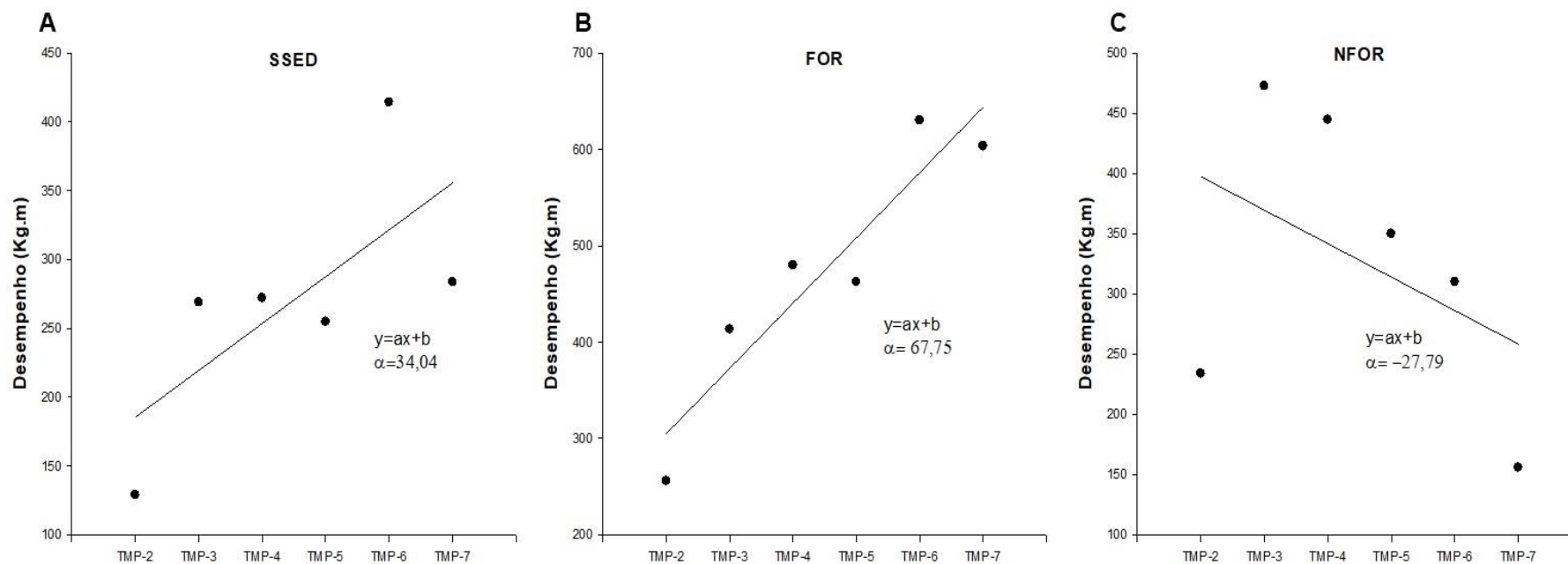


Figura 8. Representação da quantificação individual do grau de inclinação (α), obtido a partir de função linear ($y = ax+b$), de três ratos Wistar, respectivamente dos grupos AT (Gráfico A), FOR (Gráfico B) e NFOR (Gráfico C), após TMP-7. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional.

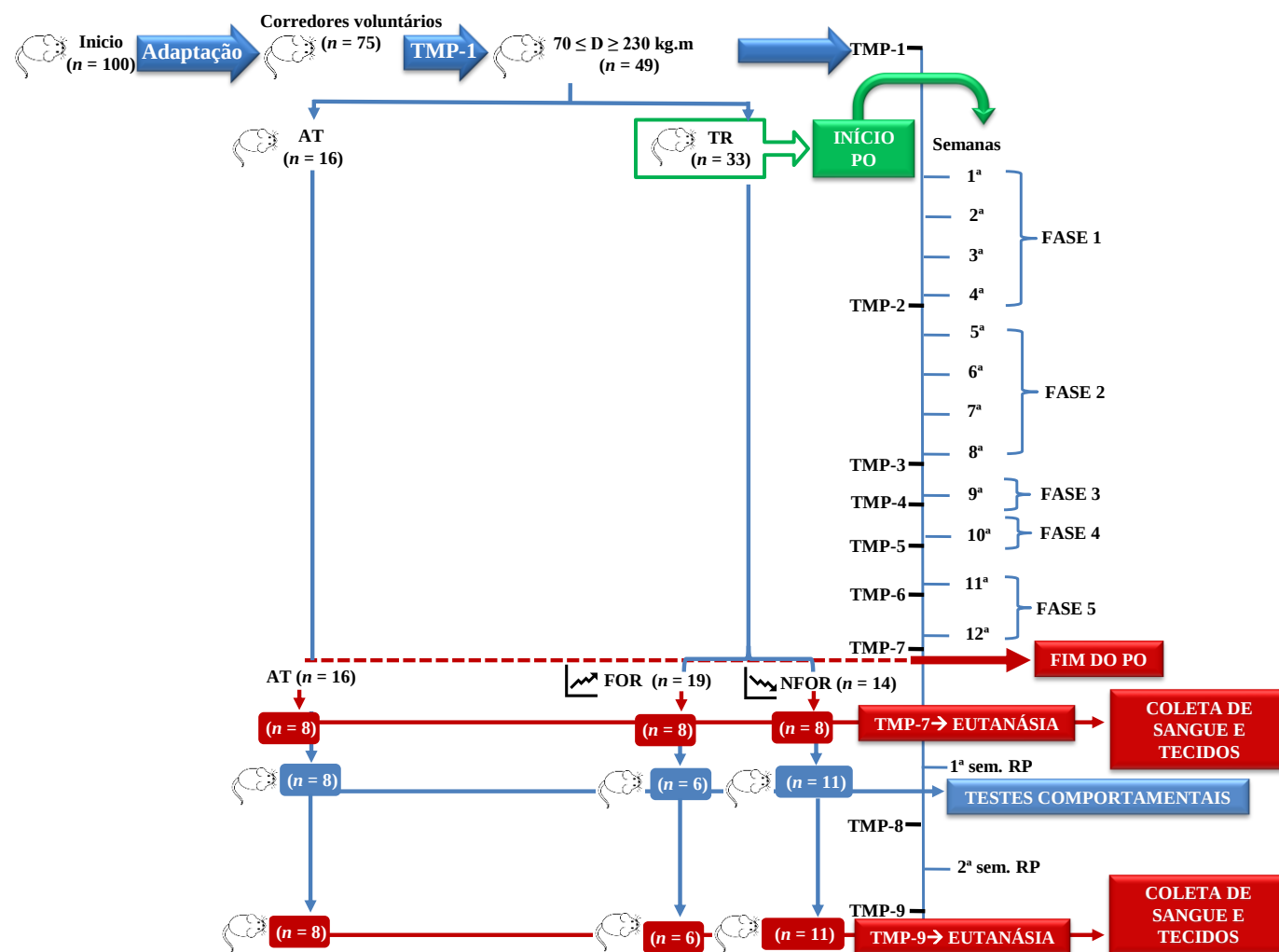


Figura 9. Fluxograma do experimento. D, desempenho (kg.m); AT, grupo ativo; TR, grupo treinado; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance; sem., semana; RP, recuperação passiva (Fonte: O autor).

4.6. Citrato sintase

As análises laboratoriais foram realizadas em parceria com Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX), da Universidade de Campinas (UNICAMP – Câmpus Campinas). Para quantificação da citrato sintase (CS) foi utilizada a técnica de *western blotting*. Para o lisado total, 50 mg do músculo gastrocnêmio foi pulverizada sob nitrogênio líquido e o músculo em pó foi homogeneizado em tampão de lise (50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS e inibidor de protease (Sigma-Aldrich®) por meio de sonicação, em um tubo falcon contendo gelo e água. Ato contínuo, os homogenatos foram mantidos sob banho em fase de gelo e água por 20 minutos. Em seguida foram centrifugados por 10 minutos a 1000g. Prontamente, o conteúdo sobrenadante foi separado e as proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (adaptado: ERNST;ZOR, 2010). Utilizou-se 20 µg de proteína, a qual foi previamente diluída em 140 µL tampão (100 mM Tris-Cl pH 8,3, 20 µL de 1 mM DTNB [5,5'dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)] (Sigma-Aldrich), 20 µL de 3 mM de Acetil-CoA (Sigma-Aldrich). Logo após foram realizadas 13 leituras consecutivas (15 segundos com período de intervalo entre leituras de 3 minutos) à 412 nm. Após a leitura inicial 20 µL de 5 mM de Oxaloacetato (Sigma-Aldrich) foram adicionados para iniciar a reação e a releitura da absorbância nos mesmos padrões anteriores. A atividade da CS foi expressa em nmol.min⁻¹µg de proteína⁻¹ (Srere, 1969; Dias, 2019).

4.6.1. Western Blotting

Utilizou-se 30 µg de amostras de lisado total e as frações subcelulares (10 µg de proteína) foram pipetados em gel de SDS-PAGE e a transferência foi realizada em membrana de PVDF (Bio-Rad). Para o bloqueio, utilizou-se BSA (*Bovine Serum Albumin*) 3% a temperatura ambiente, pelo período de 1 hora. As mesmas foram incubadas com anticorpo primário para GAPDH (Santa Cruz, 1:1000), utilizado como

controle endógeno e CS (ABCAM, 1:1000) ambos *overnight*. Logo após realizaram-se as lavagens e as membranas foram incubadas à temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado a HRP (CST, 1:5000) por 1 hora. Ato contínuo, as mesmas foram reveladas em foto documentador (UV Tech) utilizando ECL (Thermo Fisher). As bandas foram quantificadas pelo software *imageJ*.

4.7. Glicogênio muscular e hepático

As quantificações do conteúdo de glicogênio hepático e muscular foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (LAFAE), da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP – campus Limeira). As mesmas foram transportadas da FCAV-UNESP até a FCA-UNICAMP em caixa de isopor contendo gelo seco. Para quantificação de glicogênio pesou-se em balança analítica de precisão aproximadamente 200-250 mg para os músculos sóleo, gastrocnêmio medial e lateral e semimembranáceo e 500 mg do fígado. Ato contínuo, os tecidos foram depositados em tubos de ensaio contendo hidróxido de potássio (KOH) e levados ao banho-maria para que ocorresse o processo de digestão. Adicionou-se sulfato de sódio (Na_2SO_4) em cada um dos tubos. Em seguida, o glicogênio precipitado foi purificado com álcool etílico 70% (BECK et al., 2015). A concentração de cada amostra foi analisada por meio de método colorimétrico fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956).

4.8. Corticosterona

Coletas sanguíneas foram realizadas imediatamente após o TMP-7 e TMP-9 para quantificação da corticosterona. Aproximadamente três minutos após os testes máximos de performance, os ratos foram anestesiados via intraperitoneal (i.p), com associação anestésica que continha cetamina, xilazina e acepromazina nas doses de

5.56, 0.55 e 0.11mg.kg⁻¹, respectivamente (Steiner et al., 2004) e o sangue coletado por meio de punção cardíaca. As amostras foram armazenadas em tubos de 4 mL contendo heparina sódica. Todas as amostras sanguíneas foram centrifugadas numa temperatura de 4° C, 10 min a 1900g, sendo o plasma separado em alíquotas em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20°C até o momento das análises.

Todas as análises foram feitas pelo método de radioimunensaio, no Laboratório de Neuroendocrinologia do Estresse e Reprodução da Universidade de São Paulo (USP- Ribeirão Preto, Brasil). Realizou-se extração prévia com etanol e utilizaram-se padrão e anticorpo específico (SigmaCo., [St. Louis, MO, EUA](#)) e corticosterona triciada adquirida da NEN (Boston, MA, EUA). A separação das frações livre e ligada foi realizada com carvão-dextran (0,5/0,05%). A concentração mínima detectável foi de 0,08 ng.mL⁻¹, sendo que os coeficientes de variação intra e interensaio foram 4.5% e 11.4%, respectivamente.

4.9. Testes comportamentais

Realizaram-se testes labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto (CA) na primeira semana de recuperação passiva (RP1). Os ratos foram submetidos ao LCE duas vezes consecutivas, com 1 dia de intervalo entre as medições. Já o CA foi realizado uma única vez. Os testes ocorreram no período das 13:00 às 17:00 h. Utilizaram-se cronômetros e contadores para mensuração das variáveis avaliadas, que foram quantificadas por um observador que permaneceu numa sala separada. Cada rato foi avaliado individualmente pelo período de 5 minutos, por meio de uma câmera ligada a uma televisão. Para eliminação dos possíveis sinais odoríferos deixados pelo rato antecessor, entre um teste e outro os aparelhos foram limpos com solução hidroalcoólica 5% (v/v).

Composto por uma arena circular com o fundo demarcado em parcelas (**Figura 11**), no CA foram mensuradas as seguintes variáveis comportamentais: frequência de locomoção, levantar, autolimpeza corporal (*grooming*), defecação, micção e período de imobilidade. O LCE possui dois braços abertos cruzados por dois braços fechados,

elevados a 50 cm do chão (**Figura 10**). Os ratos foram posicionados no centro do aparelho com a cabeça virada para um dos braços fechados. Contabilizaram-se o número de entradas e o tempo de permanência em cada braço. Posteriormente, calculou-se as porcentagens de entrada e de tempo despendido nos braços abertos conforme mostrado abaixo:

$$\% \text{ de entradas no braço aberto} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de entradas BA} \times 100}{\text{Total de entradas BA+BF}}$$

$$\% \text{ de tempo no braço aberto} = \frac{\text{Tempo em BA} \times 100}{\text{Total de tempo BA+BF}}$$

Onde: BA= Braço aberto; BF= Braço fechado.



Figura 10. Teste de labirinto em cruz elevado

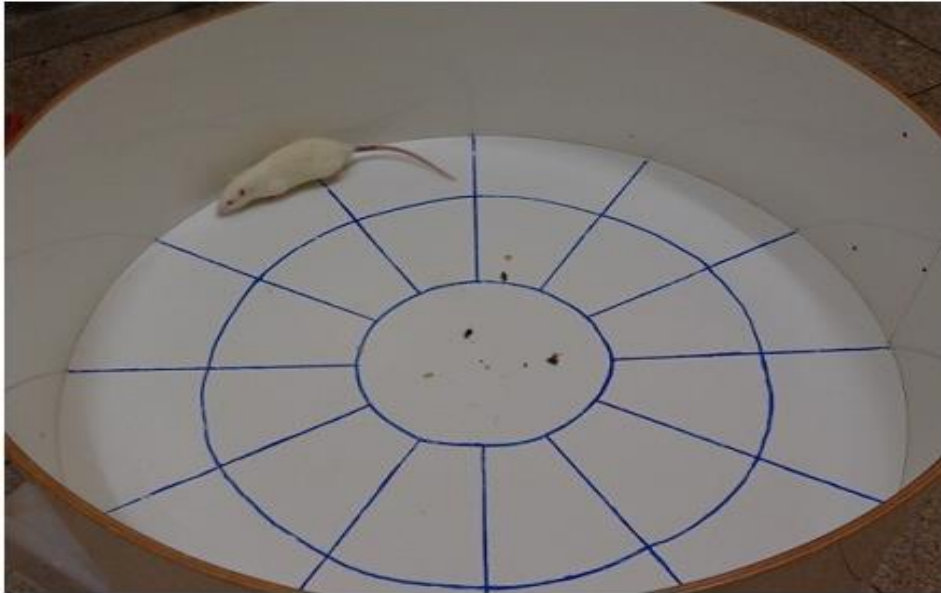


Figura 11. Teste de campo aberto

4.10. Mensurações de lactato e glicose sanguíneos

As coletas de sangue para análise das concentrações de lactato ([lac]) e glicose ([glic]) foram realizadas antes e logo após os TMP-2, 6 e 9 (máximo) e submáximo (logo após primeiro treino do dia à 23 m.min^{-1} e 25 m.min^{-1}). Para tanto, todas as amostras foram obtidas pela punção da extremidade distal da cauda. As concentrações de lactato e glicose foram quantificadas pelo método eletro-enzimático em bioanalisador (YSI 2300 STAT PLUS, YSI Incorporated, OH, USA).

4.11. Índices somáticos

Após os TMP-7 e 9 os ratos foram anestesiados de acordo com o protocolo descrito no item 4.9 e posicionados em decúbito dorsal. Realizou-se incisão cutânea e subcutânea na linha alba, sendo o peritônio parietal e os órgãos expostos. Em seguida, as glândulas adrenais, fígado, coração e timo foram cuidadosamente

removidos e pesadas em balança analítica (GR-202-AND company, TO, Japão). O peso relativo de cada órgão de cada rato (índice adrenossomático – AI; hepatossomático – HI; cardiossomático – CI e timossomático - TI) foi realizado por meio da seguinte relação:

$$\frac{\text{Massa do órgão}}{\text{Massa corpórea}} \times 100$$

4.12. Análises biomoleculares de transportadores de monocaboxilatos (MCT1 e MCT4) e da proteína auxiliar CD147 em ratos Wistar

Essa análise foi desenvolvida junto ao Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (LAFAE), da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP – campus Limeira). Para tal, como mencionado no item 4.9, o músculo gastrocnêmio branco foi cuidadosamente retirado, limpo e congelado em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 ° C para análise subsequente de MCT1, MCT4 e CD147 pela técnica de *Western Blotting*.

4.12.1. Extração das proteínas

Os músculos (15 a 25 mg) foram homogeneizados em tampão de lise – Tris Cl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCL}$), NaCl, EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), NP-40, Deoxycolate ($\text{C}_{24}\text{H}_33\text{NaO}_4$), SDS (Sodium dodcyl sulfate) e 1% coquetel de inibidor de protease e fosfatase, pH 7,4). Logo após adicionar o tampão de lise aos microtubos, iniciou-se a maceração das amostras. Esta foi realizada manualmente, dentro de recipiente com gelo, mexendo delicadamente com pistilo, até que se obteve uma amostra homogênea. Em seguida, cada amostra foi sonicada 2 vezes à 60% de intensidade por 5 segundos. Posteriormente, os lisados foram centrifugados a 12000 rpm, por 10 minutos à 4°C. Logo após, o sobrenadante foi separado (extrato total de proteínas) e o pellet descartado.

4.12.2. Quantificação de proteínas totais

Para quantificação de proteínas totais foi utilizado o método de *Braford*. Para tanto, utilizamos microplacas com 96 poços cada, consistindo em volume final de 200ul em cada poço da placa. A curva padrão foi feita com concentrações de BSA (soro albumina bovina). Em seguida, diluímos o BSA em tampão RIPA e pipetamos 10ul de cada padrão na placa. Ato contínuo, pipetamos as amostras de proteínas totais obtidas no item 4.13.1 na microplaca e adicionaremos 200 uL de reagente *Bradford*. Após 5 minutos, fez-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro.

4.12.3. Eletroforese

Uma alíquota de cada amostra foi diluída em água e solução LDS e Mercaptoethanol (1%). Em seguida, pipeta-se 40 µg de proteína somadas a 3 µL de LDS e adicionado água Mili-Q até que se atinja o volume de 12 µL no microtubo. Logo após as amostras foram levadas ao banho seco a 94°C pelo período de 10 minutos. Imediatamente após, as amostras foram colocadas em gelo pelo período de 5 minutos.

Ato contínuo, pipetou-se 7,5 µL de marcador de peso molecular no primeiro poço do gel pronto (Invitrogen®) e, em seguida, pipetou-se 9 µL de cada amostra nos poços do gel para posterior separação por eletroforese. Para tanto, usaremos tampão MES (Invitrogen®) para corrida de eletroforese, à 130 V constantes por 60 minutos. As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, por meio do sistema de transferência à seco Iblot².

4.12.4. *Western Blotting* das proteínas MCT1, MCT4 e CD147

Com a membrana seca, realizou-se a quantificação das proteínas totais (STAIN TOTAL PROTEIN), para tanto, a membrana foi lavada com metanol e água Mili-Q. Incubada em 5 mL com *Total Protein Stain* por 5 minutos dentro de caixa preta. Após procedimento a membrana foi lida no LI-COR®, no programa Image Studio® no channel 700 nm.

Após a leitura das proteínas totais, a membrana foi novamente lavada com metanol e água Mili-Q. Ato contínuo, realizou-se bloqueio da membrana com tampão *phosphate buffered saline* (PBS 1% MILK) por 1 hora em agitador orbital. Em seguida foi realizada a incubação *overnight* com anticorpos primários para MCT1 (Bioss, 1:1000) e CD 147 (Bioss, 1:1000) e por 1 hora para o MCT4 (Sigma-Aldrich, 1:1000). Logo após a lavagem do anticorpo primário, foi realizada a incubação de 1 hora, em caixa preta (sem luz), com anticorpo secundário fluorescente *Goat ant rabbit IgG H&L* (IRDye®800CW). A leitura da membrana foi realizada no Li-COR®, no canal 800 nm.

4.12.5. Análise de componentes principais (ACP)

A análise de componentes principais (ACP) é um método estatístico exploratório de dados obtida pela decomposição de autovalores a partir de matriz de covariância (Pearson, 1901). ACP se enquadra no grupo de análises multivariadas, que de forma geral, se refere a analisar duas ou mais variáveis simultaneamente, permitindo descrever o comportamento da variável explanatória por meio de mais de uma variável preditora. A partir da matriz de covariância entre as variáveis são obtidos os autovalores e seus correspondentes autovetores.

Os autovetores, chamados de componentes principais, são uma combinação linear das variáveis originais visando obter a relativa importância de cada variável em relação aos componentes principais. O número de componentes principais será igual ao número de variáveis originais, sendo ordenados de forma decrescente em função da quantidade de variação capturada por cada componente. Os sinais positivos ou negativos dos autovalores indicam as relações direta e inversamente proporcionais

entre as variáveis. Por ser construída com base na matriz de covariância, outra aplicação da ACP é a redução na dimensionalidade das variáveis preditoras, ou seja, selecionar apenas as variáveis preditoras menos correlacionadas, mantendo apenas as variáveis mais relevantes para expressar a variação total em um modelo parcimonioso (Bernardi et al. 2009).

Como sistema complexo, o organismo atua como um todo inseparável e integralizado que não pode ser circunscrito somente à análise quantitativa univariada de seus sistemas ou funções fisiológicas, especialmente quando abordadas de modo compartimentalizado (West, 2006). Exemplificando, quando a homeostase é interrompida de maneira transitória, como é o caso do exercício agudo ou crônico, o sistema cardiovascular e a função cooperativa dos seus múltiplos subsistemas (e.g. função sistólica ou distólica) são interdependentes e interagem de forma dinâmica e não linear. Estas relações interdependentes não são proporcionais. Portanto, precisam ser abordados por meio de modelos não lineares. Essas metodologias multivariadas, com foco no aspecto integrado dos sistemas fisiológicos do organismo do atleta, devem ser consideradas nas pesquisas sobre o efeito do treinamento sobre os sistemas fisiológicos. Em humanos submetidos a diferentes modalidades de treino, pesquisadores avaliaram a coordenação cardiorrespiratória por meio da ACP. Esta análise pode ser empregada para monitoramento da integração de múltiplas variáveis de um sistema fisiológico, sendo usada numa ampla gama de campos de pesquisa biológica (Balagué et al., 2016).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva de todas as variáveis avaliadas no estudo foi realizada considerando os valores de média e desvio-padrão. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Cramer-von Mises e valores superiores a 3 vezes o intervalo interquartil foram considerados *outliers* e retirados das análises. As variáveis endócrinas, desempenho e massa corporal, lactato sanguíneo e glicose, por possuir medidas repetidas foram analisadas por meio do General Linear Model (GLM). Nas

variáveis glicogênio e corticosterona entre PT-7 e PT-9, os efeitos do tratamento e populações foi realizado por uma análise de variância com dois fatores independentes (ANOVA-*two way*), sendo a homoscedasticidade atendida segundo o teste de Levene. Os contrastes dentro dos fatores foram obtidos por meio do teste de Bonferroni ou Tukey. As análises de componentes principais (ACP) foram baseadas na matriz de correlação entre as variáveis. Os dois primeiros autovetores com maior porcentagem de variância acumulada foram considerados para construção dos gráficos. As elipses de confiança indicam o grau de agrupamento dos grupos avaliados com base em um coeficiente de 0,95. Todas as análises foram realizadas no Software R (*R Core Team*, 2020).

6. RESULTADOS

6.1. Massa Corporéa dos grupos durante os TMPs

A massa corpórea (MC) é importante indicador da síndrome de *overtraining*, sendo que a pesagem foi realizada imediatamente antes dos TMPs. A partir do TMP-4 até o TMP-7, houve redução do MC para os grupos FOR e NFOR em relação ao grupo AT ($P < 0,001$). No TMP-8 houve redução do grupo NFOR em relação ao grupo AT ($P < 0,01$). No TMP-9, correspondente à segunda semana de recuperação passiva (RP2), os MCs dos grupos FOR e NFOR se igualaram ao AT ($P > 0,05$) (**Figura 12**).

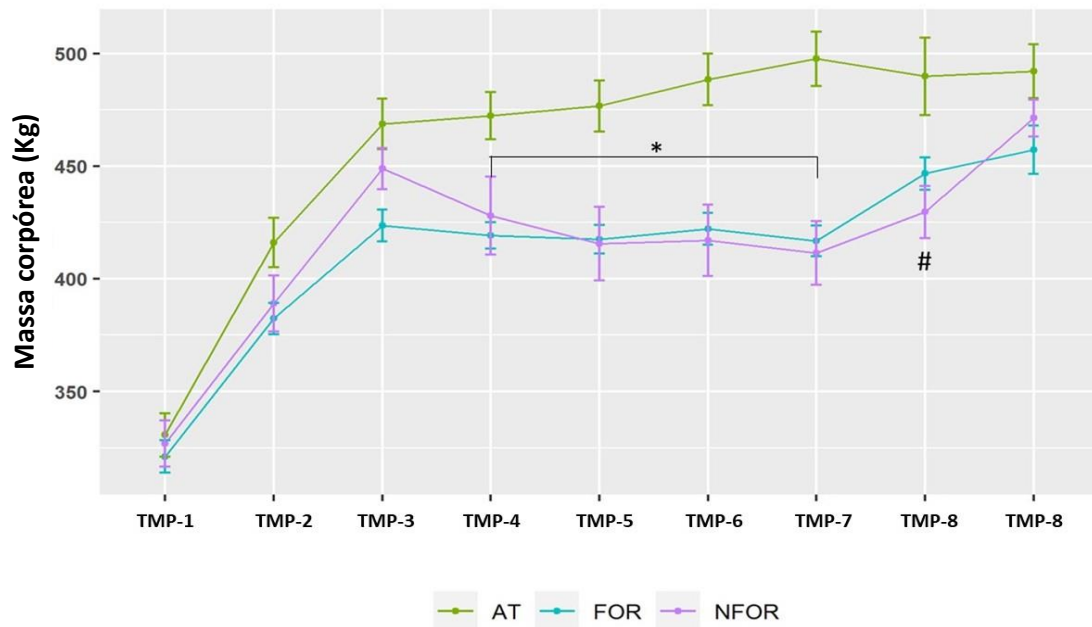


Figura 12. Massa corpórea (MC) ao longo dos TMP-1 a 9 nos diferentes tratamentos. De TMP-1 a 7: AT, n=16; FOR, n=19; NFOR, n=14. TMP-8 e 9: AT, n=8; FOR, n=11; NFOR, n=6. *Redução dos grupos FOR e NFOR em relação ao AT. # Redução do grupo NFOR em relação ao AT. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance.

6.2. Desempenho dos grupos de TMP-1 a TMP-9

A partir do protocolo de *overtraining* (PO) previamente desenvolvido (Hohl et al., 2009), foi possível demonstrar o desequilíbrio carga-recuperação, com redução no desempenho dos ratos e distinção entre as condições FOR e NFOR. Após as três semanas adaptativas, foi obtido percentual de ratos corredores de 75%. Para a confirmação das condições FOR e NFOR em ratos, utilizou-se o desempenho (D), obtido a partir de TMP's. Não houve diferença estatística no desempenho intragrupo para o grupo AT. Os grupos FOR e NFOR aumentaram a sua aptidão física a partir do TMP-2 ($P < 0,001$). NFOR teve redução de desempenho no TMP-7 ($P = 0,001$) que se manteve até o final do período de recuperação passiva (TMP-8 e TMP-9) (**Figura 13**). No TMP-1, não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$). Quando comparado ao grupo AT, os grupos FOR e NFOR obtiveram desempenho maior a partir do TMP-2, ($P < 0,001$) até TMP-6. FOR e NFOR começaram a se diferenciar a partir do TMP-5 ($P < 0,001$), sendo que este comportamento permaneceu até o TMP-7 ($P < 0,001$). No TMP-8 e 9 não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$) (Figura 11). Vale ressaltar a despeito do valor da performance para o grupo FOR ($P = 0,07$; $P = 0,70$, respectivamente), em uma análise descritiva, que foi aproximadamente 42% e 20% maior que o grupo NFOR, respectivamente (**Tabela 3; Figura 14**).

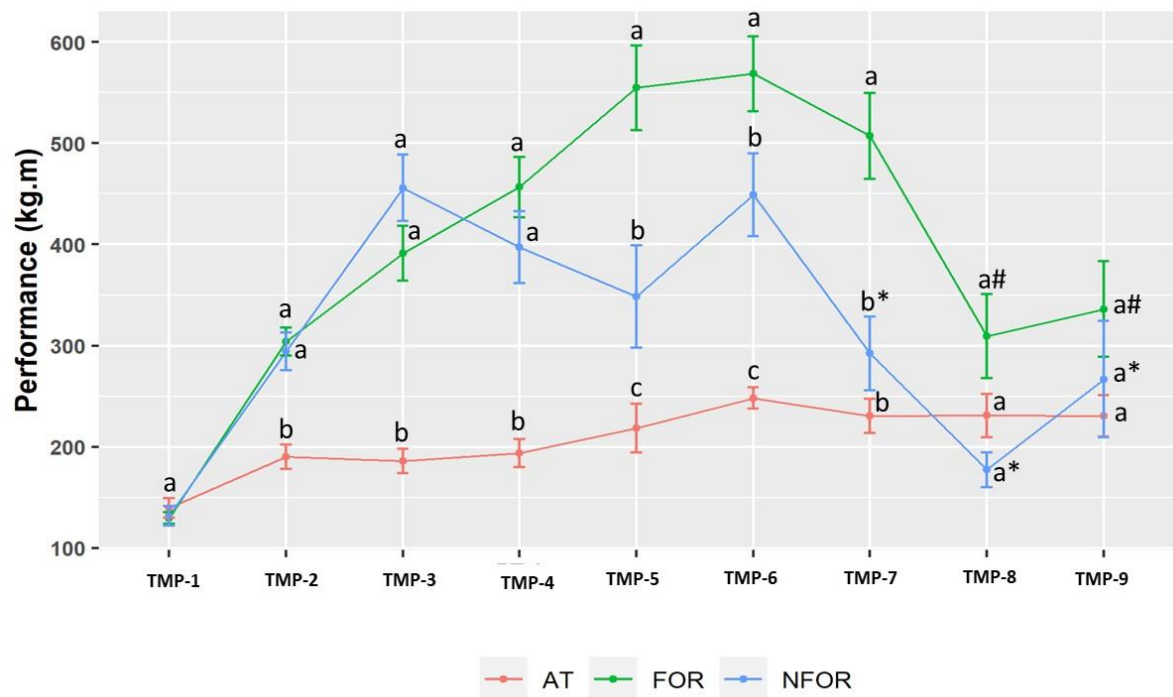


Figura 13. Performance ao longo dos TPM-1 a 9 nos diferentes tratamentos. De TMP-1 a 7: AT, n=16; FOR, n=19; NFOR, n=14. TMP-8 e 9: AT, n=8; FOR, n=11; NFOR, n=6. # Indica redução de desempenho intragrupo em relação ao TMP-7 ($P < 0,05$). * Indica redução de desempenho intragrupo em relação ao TMP-6 ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$). AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance.

Tabela 3. Análise descritiva da performance (Kg.m) dos grupos nos TMP-8 e TMP-9 de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Variável	Tratamento	N	Média	DP
TMP-8	AT	8	230,93	60,32
	FOR	10	309,50	131,79
	NFOR	6	177,38	42,11
TMP-9	AT	8	230,55	58,43
	FOR	10	335,99	149,28
	NFOR	6	266,68	140,86

n: número de observações; DP: Desvio-padrão. TMP: Teste máximo de performance

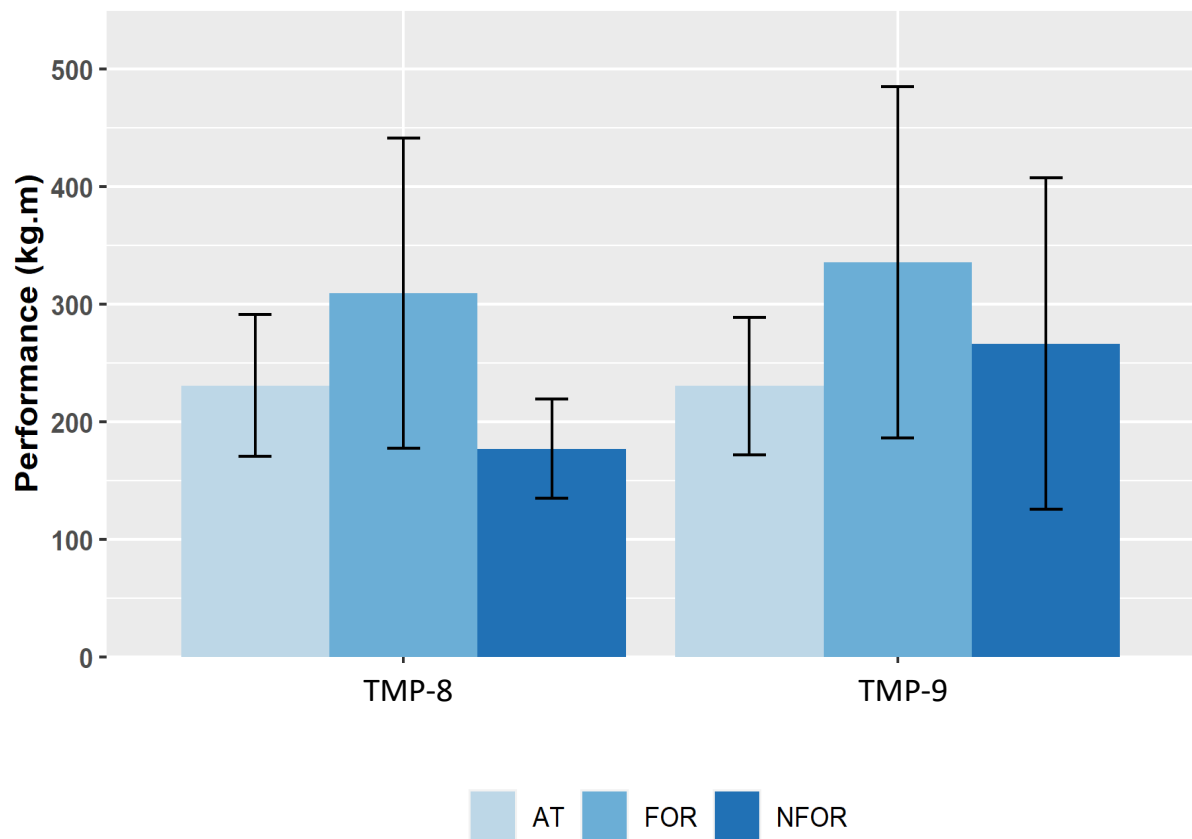


Figura 14. Performance em TMP-8 e 9 nos diferentes tratamentos. TMP-8 e 9: AT, n=8; FOR, n=11; NFOR, n=6. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance.

6.3. Atividade e conteúdo protéico da Citrato Sintase (CS)

A **Figura 15** revela que não houve diferença significativa na atividade da CS entre os grupos. A **Figura 16** demonstra os resultados obtidos pela técnica de *western blotting* para CS, a qual foi relativizada pelo GAPDH, e demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos AT, FOR e NFOR.

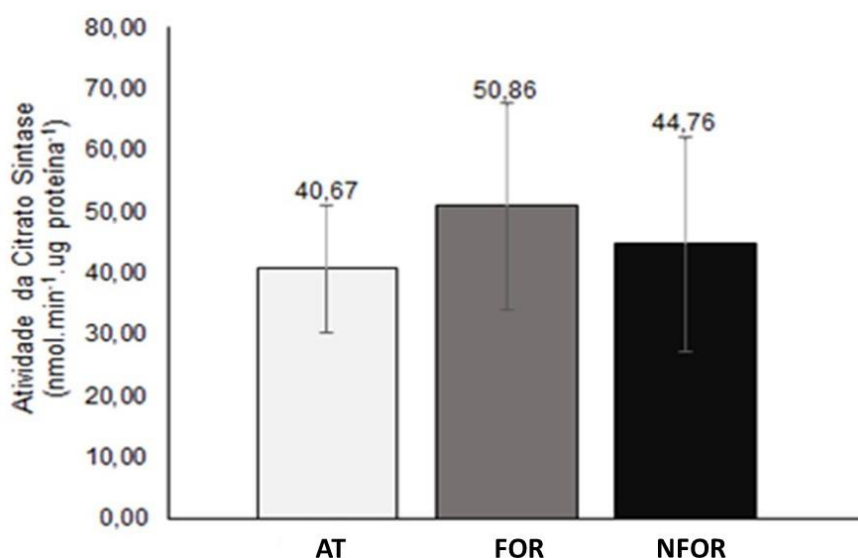


Figura 15. Atividade da citrato sintase dos ratos dos grupos AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional e NFOR, *overreaching* não funcional. Dados em média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 4. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de citrato sintase de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Variável	n	Razão citrato sintase/GAPDH				Tukey
		Média	DP	Min	Max	
AT	8	0,68	0,24	0,29	1,04	a
FOR	8	0,64	0,16	0,4	0,89	a
NFOR	8	0,59	0,25	0,38	0,99	a

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; Max: valor máximo; Min: valor mínimo; Tukey: considerando diferença significativa ($P < 0,05$).

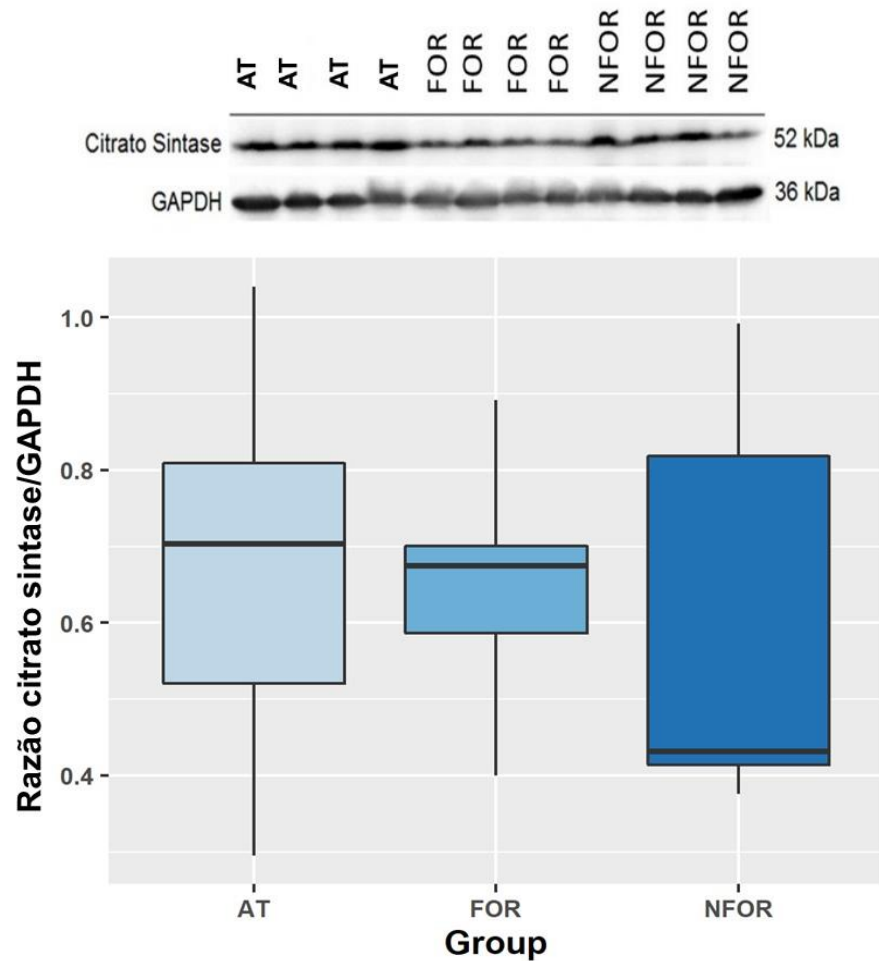


Figura 16. *Western blotting* da citrato sintase relativizada por GAPDH dos grupos AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional e NFOR, *overreaching* não funcional.

6.4. Glicogênio muscular e hepático

A despeito da quantificação de glicogênio muscular, podemos observar na **Tabela 5** que não houve interação entre população e grupo. Houve diferença entre os grupos, aonde FOR e NFOR demonstraram depleção de glicogênio de uma maneira geral em ambos TMP-7 e 9 em relação ao grupo AT no músculo sóleo (**Figura 17**). Não houve diferença entre FOR e NFOR e nem entre os tratamentos TMP-7 e 9.

Tabela 5. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de glicogênio do músculo sóleo de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Glicogênio músculo sóleo (mg.100mg ⁻¹ de tecido)						
	n	Média	DP	Min	Max	Tukey
AT	14	190,09	43,53	108,95	264,45	b
FOR	16	89,9	26,93	42,77	146,45	a
NFOR	14	70,41	34,33	33,29	152,26	a

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; Max: valor máximo; Min: valor mínimo; Tukey: considerando diferença significativa (P<0,05).

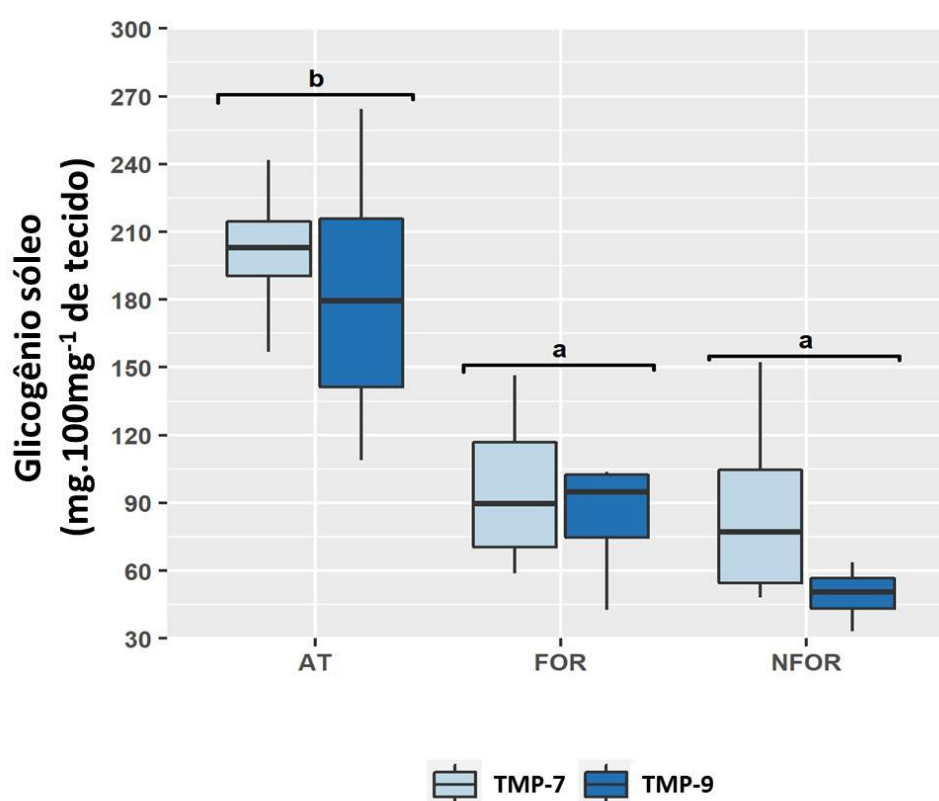


Figura 17. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio do músculo sóleo considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance.

No músculo gastrocnêmio ventre medial, podemos observar na **Tabela 6** que não houve interação entre população e grupo. E dentro de cada população não houve diferença entre os grupos. Houve diferença em NFOR, que demonstrou uma depleção de glicogênio de maneira geral em ambos TMP-7 e 9 em relação ao grupo AT no músculo gastrocnêmio medial (**Figura 18**). Não houve diferença entre FOR e NFOR.

Tabela 6. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de glicogênio do músculo gastrocnêmio ventre medial de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Glicogênio músculo gastrocnêmio ventre medial (mg.100mg ⁻¹ de tecido)						
	n	Média	DP	Min	Max	Tukey
AT	13	39,29	12,88	21,33	66,84	b
FOR	16	34,6	10,07	18,83	55,44	ab
NFOR	16	26,36	8,02	12,27	38,74	a

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; Max: valor máximo; Min: valor mínimo; Tukey: considerando diferença significativa (P<0,05).

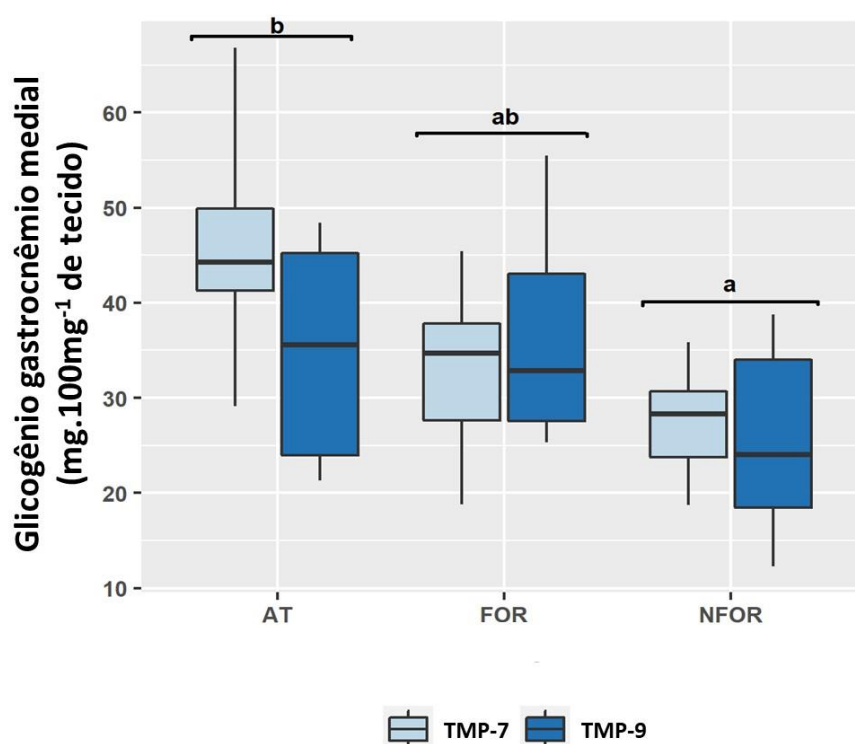


Figura 18. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio ventre medial considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance.

No músculo gastrocnêmio ventre lateral, podemos observar que houve interação entre população e grupo. NFOR e FOR demonstraram redução de glicogênio no TMP-9 (**Figura 19**). O grupo AT teve aumento de glicogênio de TMP-7 para TMP-9. Já o grupo NFOR demonstrou uma redução das concentrações de glicogênio de TMP-7 para TMP-9 (**Tabela 7**).

Tabela 7. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis do conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio ventre lateral de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Glicogênio músculo gastrocnêmio ventre lateral (mg.100mg ⁻¹ de tecido)							
Tratamento	TMP-7			TMP-9			p-valor
	n	Média	DP	n	Média	DP	
AT	4	117,4	103,17	7	240,04	86,71	0,006
FOR	8	147	54,94	8	90,91	55,36	0,101
NFOR	8	127,12	66,5	5	35,43	2,8	0,021

n: número de observações; DP: Desvio-padrão

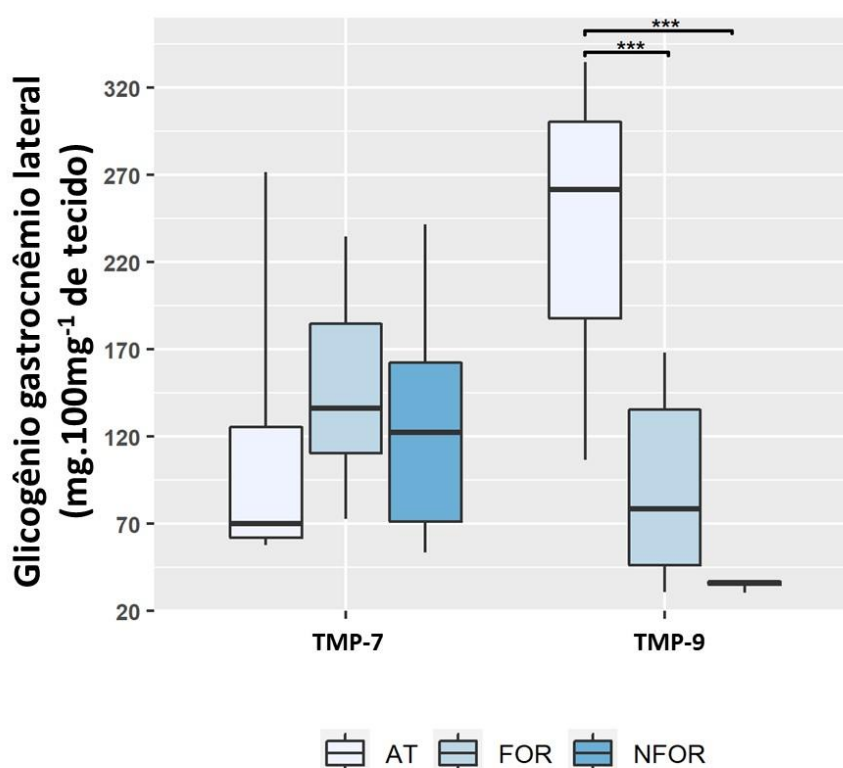


Figura 19. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio ventre lateral considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional. TMP, teste máximo de performance.

No músculo semimenbranáceo, podemos observar na **Tabela 8** e **Figura 20** que em TMP-9, de maneira geral, todos os grupos diminuíram a concentração de glicogênio em relação ao TMP-7.

Tabela 8. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis do conteúdo de glicogênio do músculo semimenbranáceo de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Glicogênio músculo semimenbranáceo (mg.100mg ⁻¹ de tecido)						
	n	Média	DP	Min	Max	Tukey
AT	14	119,29	48,9	40,4	230,28	a
FOR	16	112,34	56,05	30,99	239,93	a
NFOR	16	122,69	63,81	35,14	236,41	a

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; Max: valor máximo; Min: valor mínimo; Tukey: considerando diferença significativa (P<0,05).

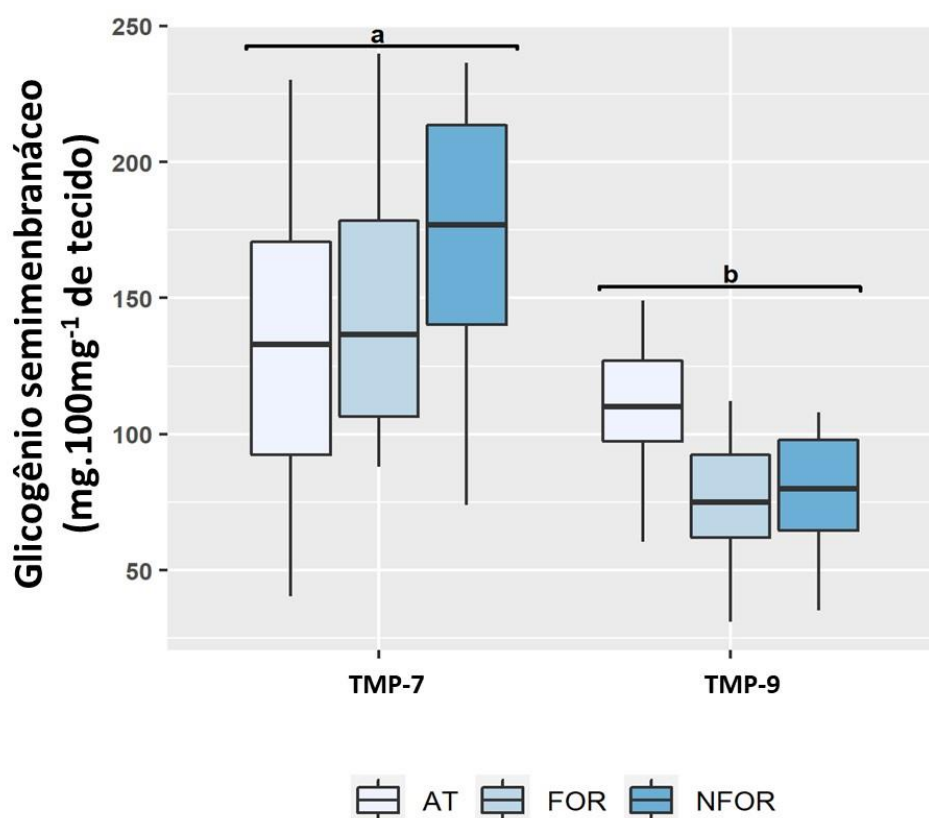


Figura 20. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio do músculo semimenbranáceo considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance.

Para o fígado, pode-se observar na **Tabela 9** que houve redução do glicogênio para os grupos FOR e NFOR de TMP-7 para TMP-9 e na **Figura 21** observa-se aumento de glicogênio para os grupos FOR e NFOR em relação ao AT em TMP-7.

Tabela 9. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de glicogênio do fígado de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Glicogênio fígado (mg.100mg ⁻¹ de tecido)							
Tratamento	PT-7			PT-9			p-valor
	n	Média	DP	n	Média	DP	
AT	8	144,88	78,53	8	283,63	125,11	0,010
FOR	5	480,08	34	8	160,39	128,04	0,001
NFOR	7	467,58	75,41	7	151,91	119,33	0,001

n: número de observações; DP: Desvio-padrão

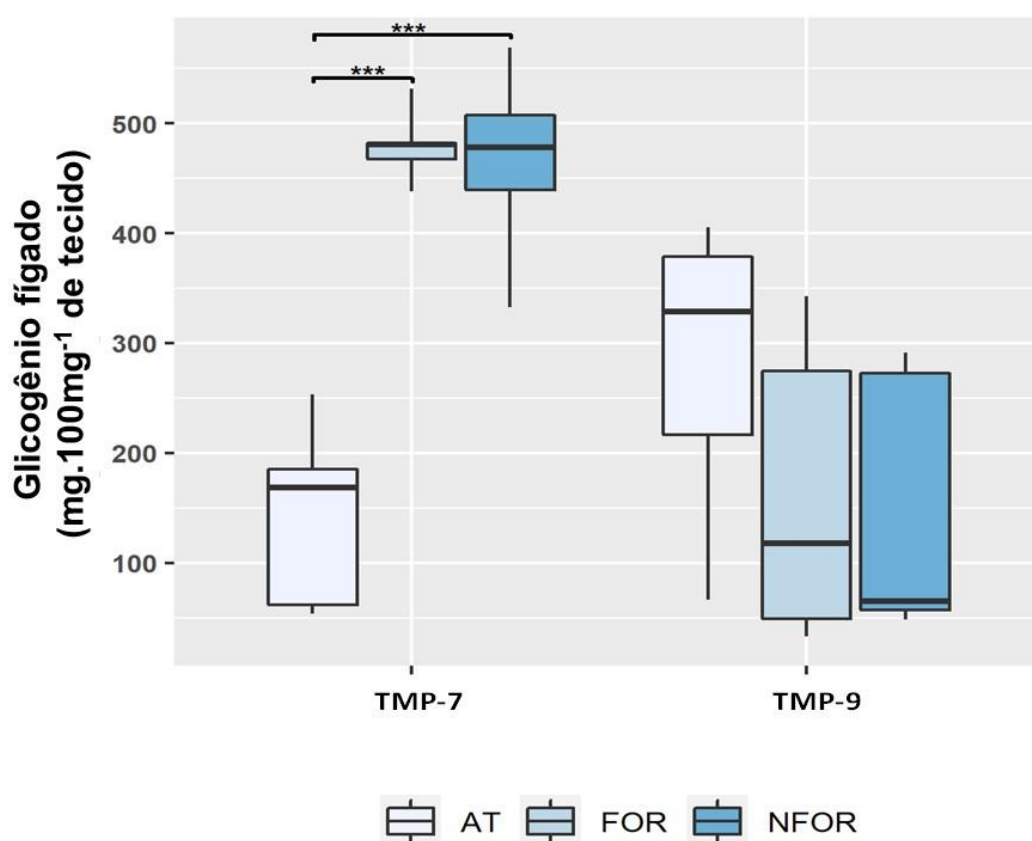


Figura 21. Comparação dos tratamentos em relação ao conteúdo de glicogênio hepático considerando as duas populações TMP-7 e TMP-9. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance.

6.5. Corticosterona

Os resultados obtidos das quantificações de corticosterona podem ser visualizados na **Tabela 10** e **Figura 22**. Não houve interação entre população e grupo. E dentro de cada população não houve diferença entre os grupos. Na **Figura 22**, pode-se observar aumento nas concentrações de corticosterona para todos os grupos em TMP-9 quando comparado ao TMP-7.

Tabela 10. Análise descritiva e efeito do tratamento nas variáveis de corticosterona de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Variável	n	Corticosterona (ng/mL)				Tukey
		Média	DP	Min	Max	
TMP-7	23	124,94	56,06	37,4	289,9	a
TMP-9	23	194,65	66,07	89,8	317,0	b

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; Max: valor máximo; Min: valor mínimo; Tukey: considerando diferença significativa ($P < 0,05$).

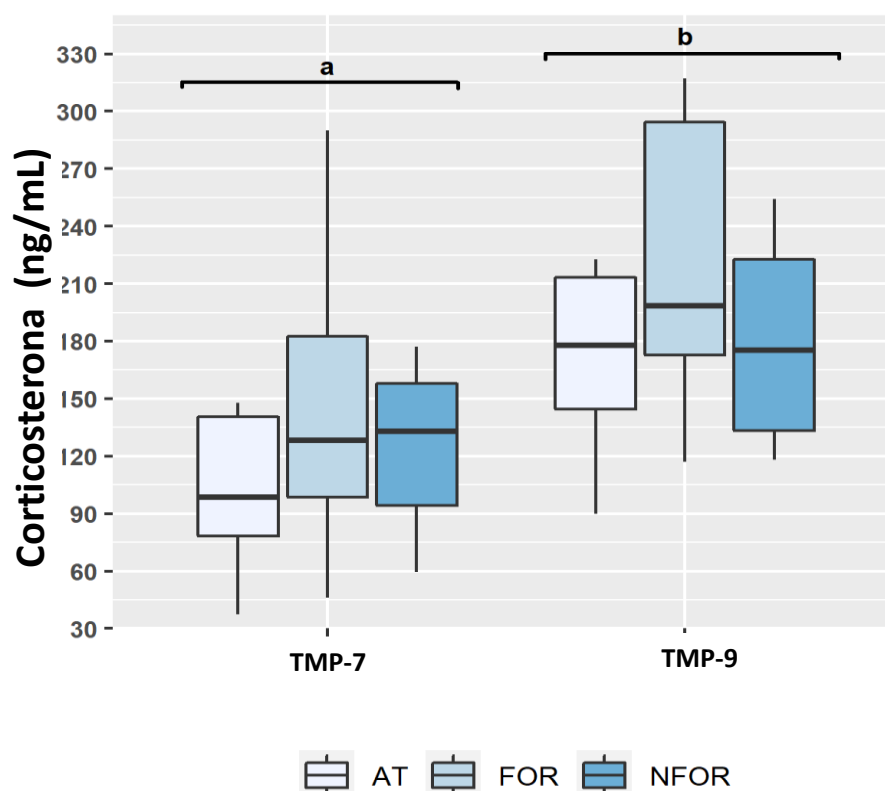


Figura 22. Comparação dos tratamentos dentro de cada variável (TMP-7 e TMP-9). AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional; TMP, teste máximo de performance.

6.6. Comportamento

As **Figuras 23** e **24** apresentam as ACPs para grupos de variáveis comportamentais para os testes de campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE), baseados na matriz de correlação entre elas. Consideram-se dois primeiros autovetores com maior porcentagem de variância acumulada para construção dos gráficos. As elipses mostraram agrupamento e diferenciação dos grupos com base num coeficiente de 0,95.

Na **Figura 23** está apresentado o comportamento descritivo das variáveis do CA (*grooming*, *rearing*, *locomotion*, *immobility time*, *fezes*, *urine*) dos grupos AT, FOR e NFOR. Os dois componentes principais foram responsáveis por 63,48% da variância observada. Do ponto de vista descritivo, foi possível observar correlação negativa inversamente proporcional para *immobility time* em relação as variáveis *rearing* e *locomotion*. Isso indica que animais com maiores valores para *immobility time*, possuem menores valores de *rearing* e *locomotion*. O mesmo foi observado na variável *grooming* em relação a *fezes* e *urine*. A disposição gráfica das variáveis para os grupos evidenciou separação do grupo AT dos demais. Ademais, as setas indicam a correlação entre as variáveis, todas tem praticamente o mesmo tamanho, isso indica que todas contribuem com praticamente a mesma proporção para explicação geral dos dados.

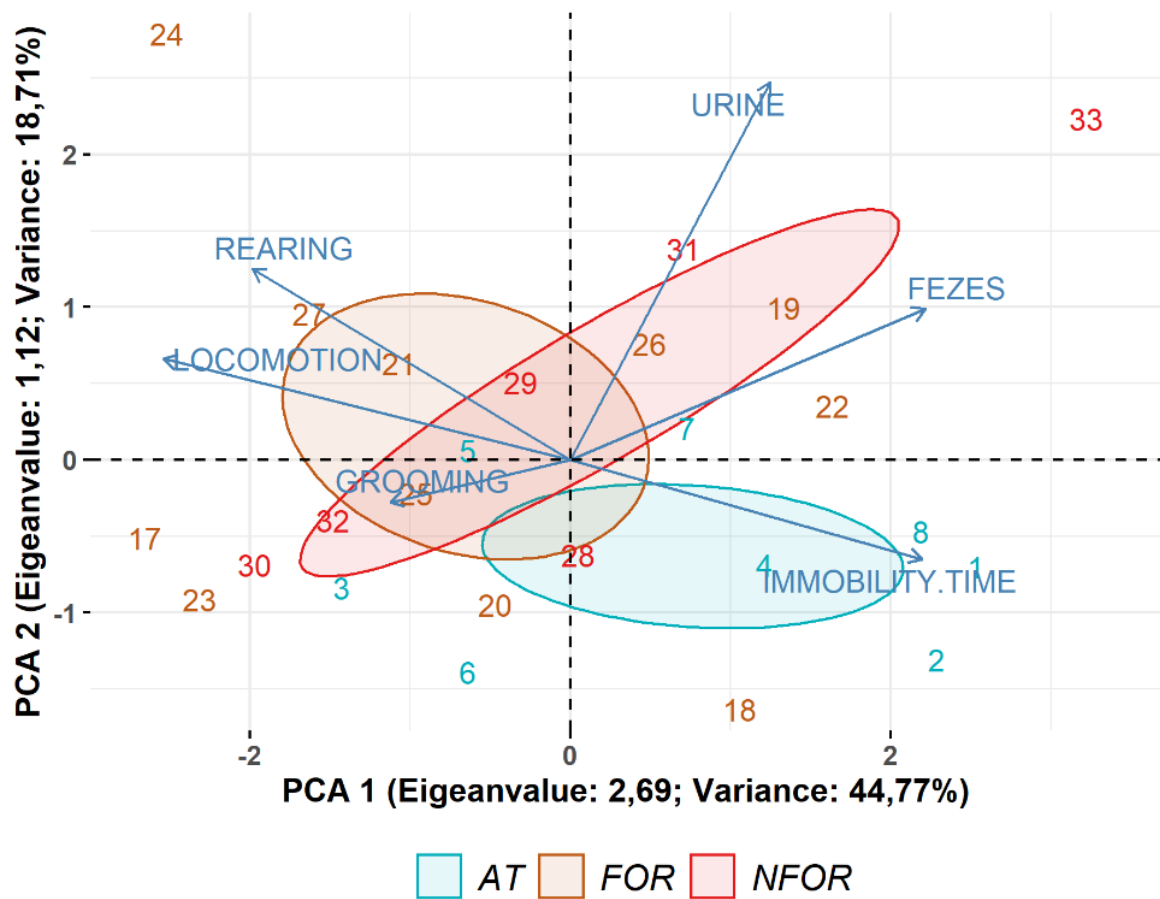


Figura 23. Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes principais dos 6 parâmetros ambientais em campo aberto com elipses de confiança de 95% agrupadas pelos três grupos. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional.

Quanto ao LCE, no primeiro teste os autovetores *enclosed Arms* e *time enclosed Arms* apresentaram correlação inversamente proporcionais aos autovetores *open Arms* e *time open Arms*. O mesmo pode ser observado para o segundo teste. Os dois componentes principais foram responsáveis por 94,1% da variância observada (**Figura 24**). A disposição gráfica das variáveis para os grupos AT, FOR e NFOR não evidenciou separação entre os mesmos. Além disso, 1º plus maze e 2º plus maze estão em quadrantes diferentes, o que representa uma relação inversa entre elas.

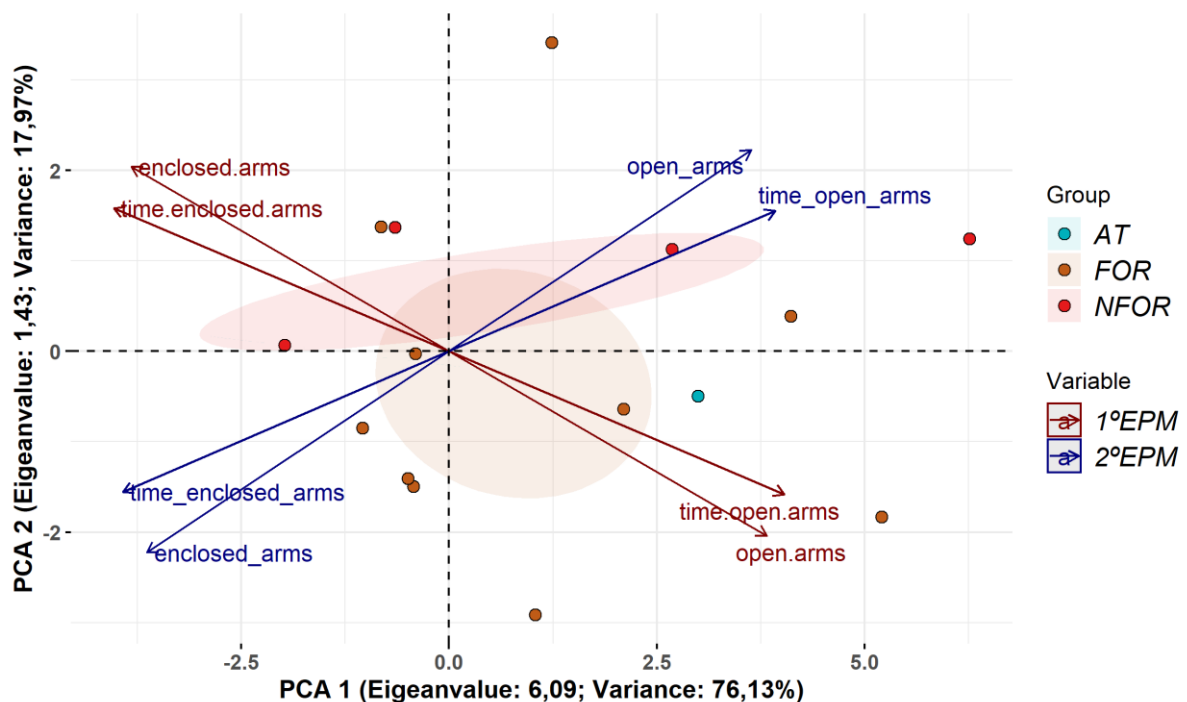


Figura 24. Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes principais dos 8 parâmetros ambientais divididos no primeiro e segundo labirinto positivo com elipses de confiança de 95% agrupadas pelos três grupos. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional. 1ºEPM, 1º teste de labirinto em cruz elevado; 2ºEPM, 2º teste de labirinto em cruz elevado.

6.7. Lactato sanguíneo e Glicose

As medidas das concentrações de lactato são consideradas como um bom indicador de esforço anaeróbio e da aptidão física. A **Figura 25** revela as concentrações de lactato máximas. Pode-se observar que em TMP-2 FOR e NFOR apresentaram menores concentrações de lactato quando comparados ao grupo AT. Em repouso antes de TMP-6, FOR e NFOR demonstraram concentração de lactato maior em relação ao grupo AT. Já em TMP-6, FOR e NFOR apresentaram menores concentrações de lactato em relação ao AT, sendo que FOR foi menor que o grupo NFOR. Não houve diferença entre as concentrações de lactato submáximas (**Figura 26**).

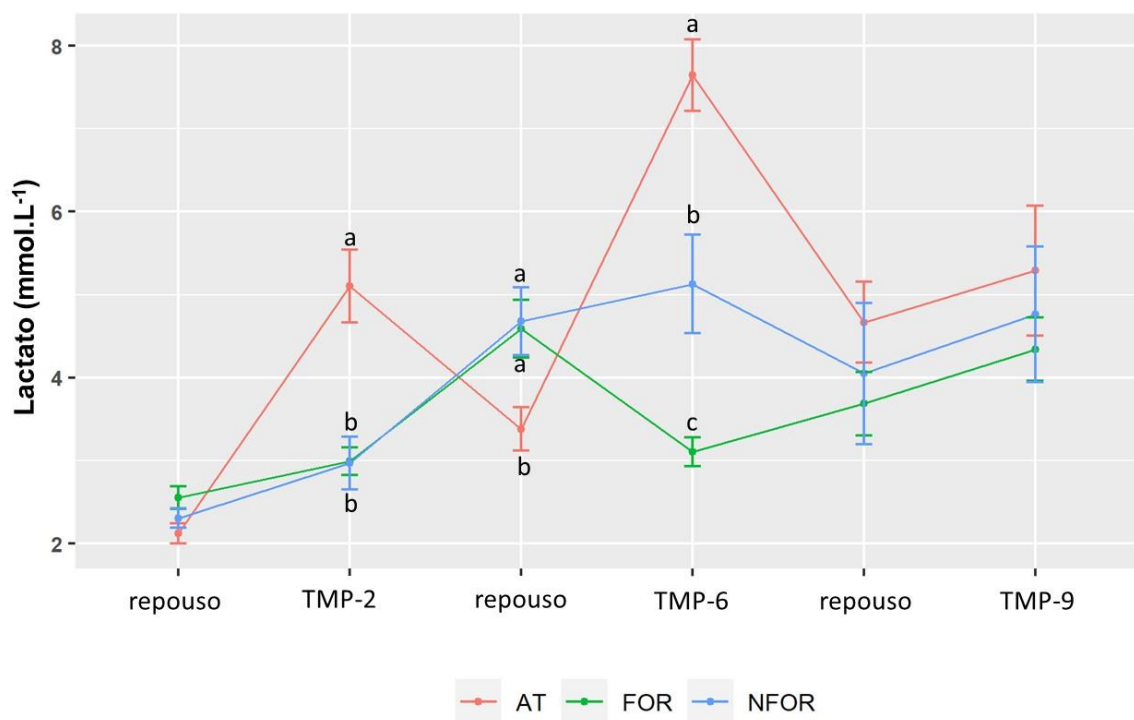


Figura 25. Lactato ao longo das variáveis nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferença entre grupos. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional. TMP, teste máximo de performance.

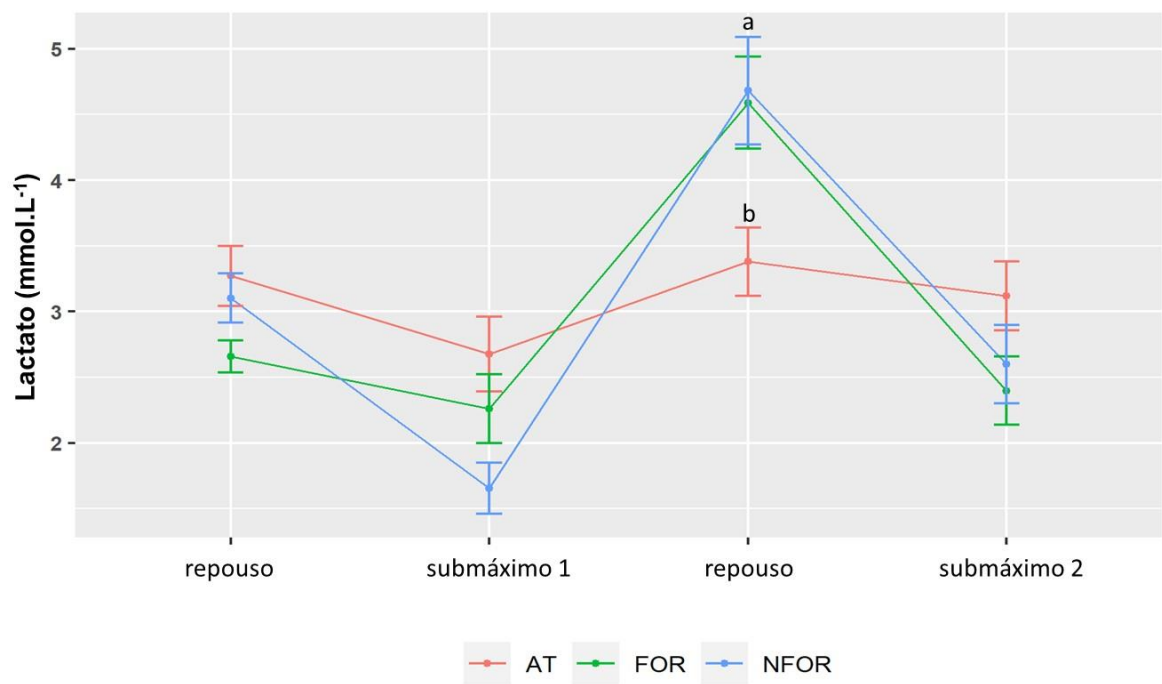


Figura 26. Lactato ao longo das variáveis nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferença entre grupos. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional.

Com relação a glicose em testes máximos, pode-se observar na **Figura 27** que no momento TMP-6 o grupo FOR demonstrou menor glicemia em relação ao grupo AT. Não houve diferença entre FOR e NFOR. Não houve diferença na glicemia submáxima (**Figura 28**).

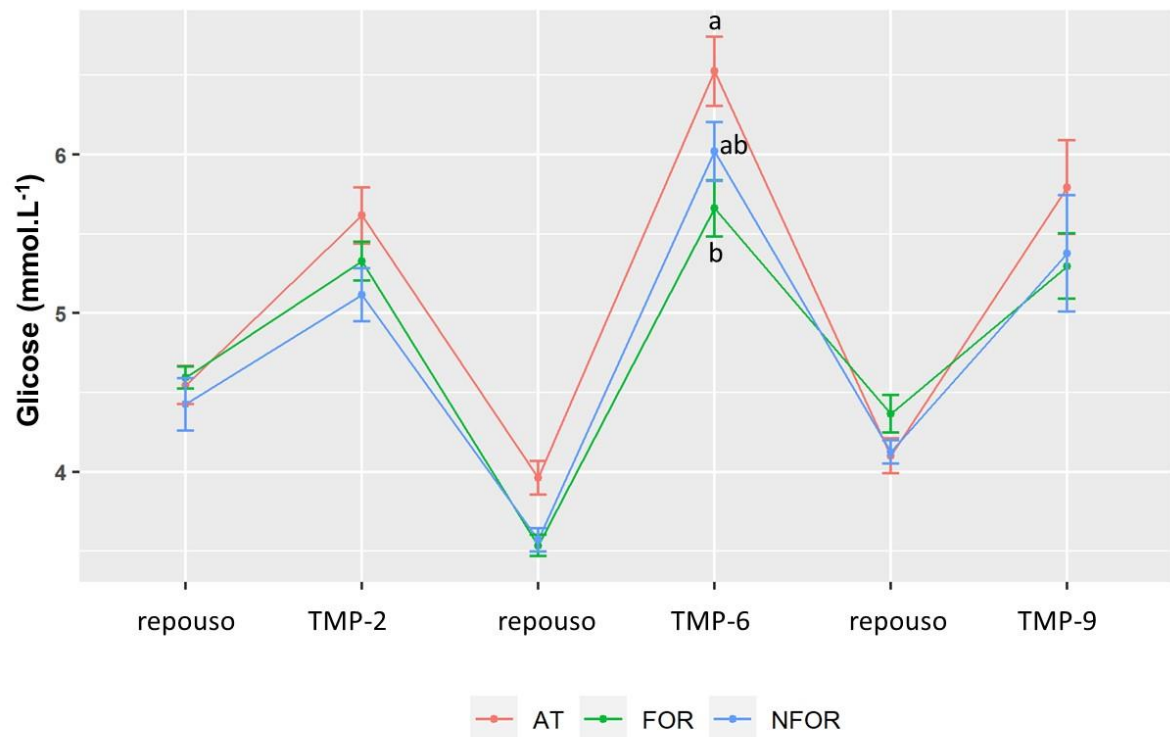


Figura 27. Glicose ao longo das variáveis nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferença entre grupos. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional. TMP, teste máximo de performance.

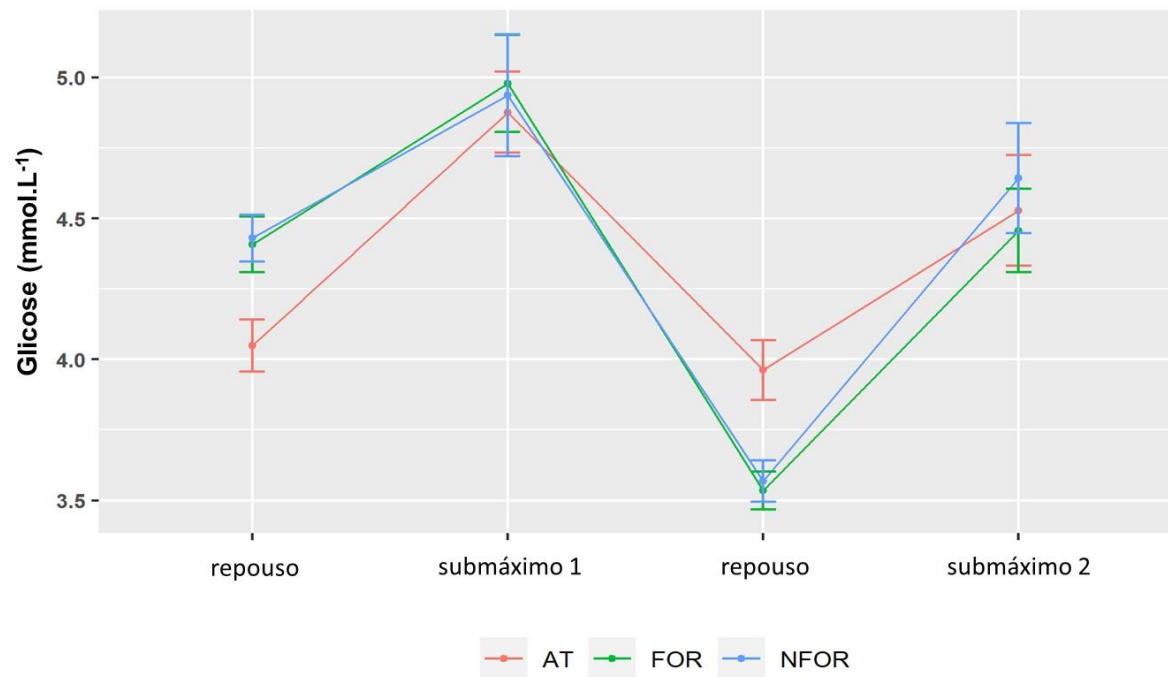


Figura 28. Glicose ao longo das variáveis nos diferentes tratamentos. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional.

6.8. Índices somáticos

As **Figuras 29 e 30** apresentam as ACPs para grupos de variáveis índices somáticos (índice adrenossomático (AI), índice cardiossomático (CI), índice hepatossomático (HI) e índice timossomático (TI)) para os testes máximos de performance 7 e 9, baseados na matriz de correlação entre elas. Consideram-se dois primeiros autovetores com maior porcentagem de variância acumulada para construção dos gráficos. As elipses mostraram agrupamento e diferenciação dos grupos com base num coeficiente de 0,95.

As setas indicam a correlação entre as variáveis, nestes casos, todas tem praticamente o mesmo tamanho, isso indica que todas contribuem com praticamente a mesma proporção para explicação geral dos dados. Ao todo, a figura 22 contém 72,22% da variação dos dados (variância PCA1 + PCA2). Na figura 23, são 82,04%. Vale ressaltar que grande parte da variância total é explicada por apenas 2 eixos da APC. A disposição gráfica das variáveis para os grupos evidenciou separação dos grupos AT, FOR e NFOR em TMP-7 (**Figura 29**).

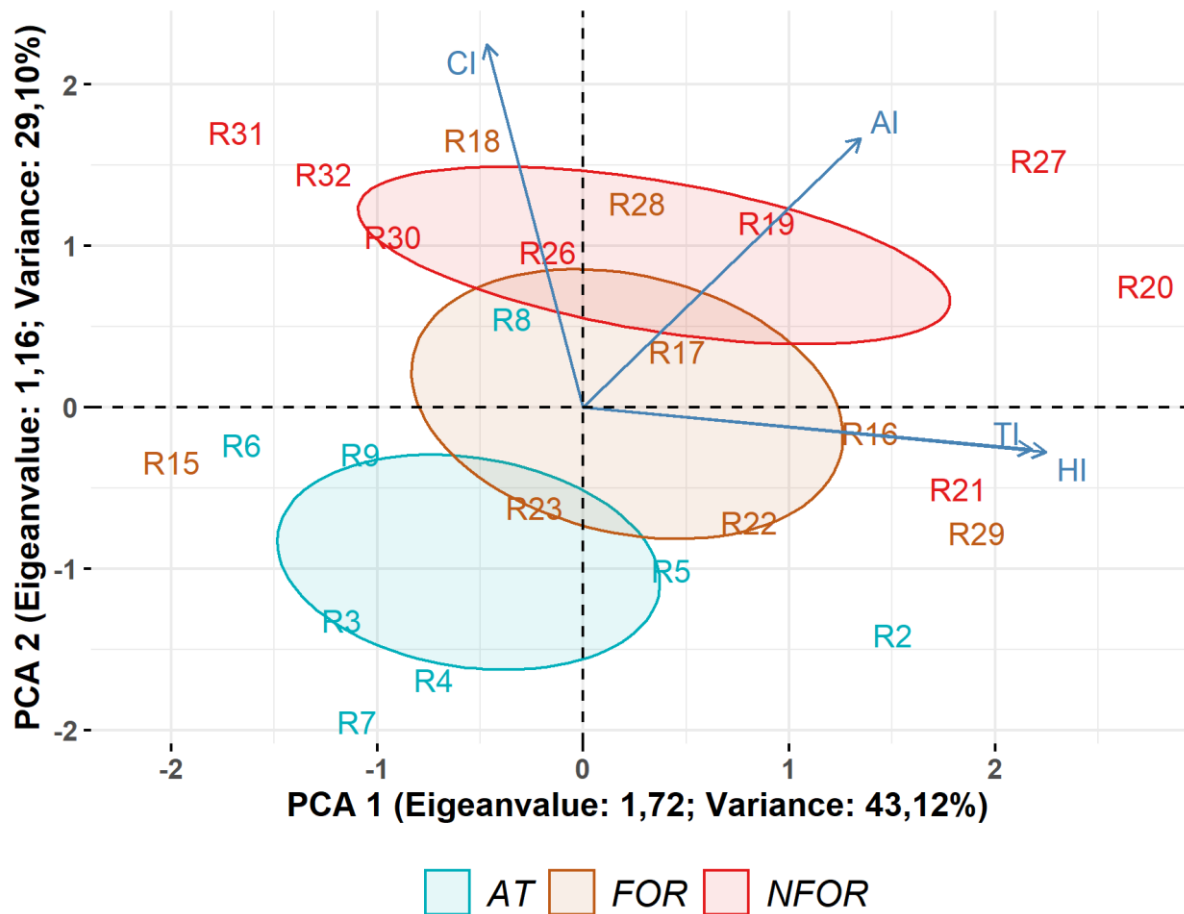


Figura 29. Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes principais dos 4 parâmetros ambientais em TMP-7 com elipses de confiança de 95% agrupadas pelos três grupos. CI, índice cardiossomático; AI, índice adrenossomático; TI, índice timossomático; HI, índice hepatossomático. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional.

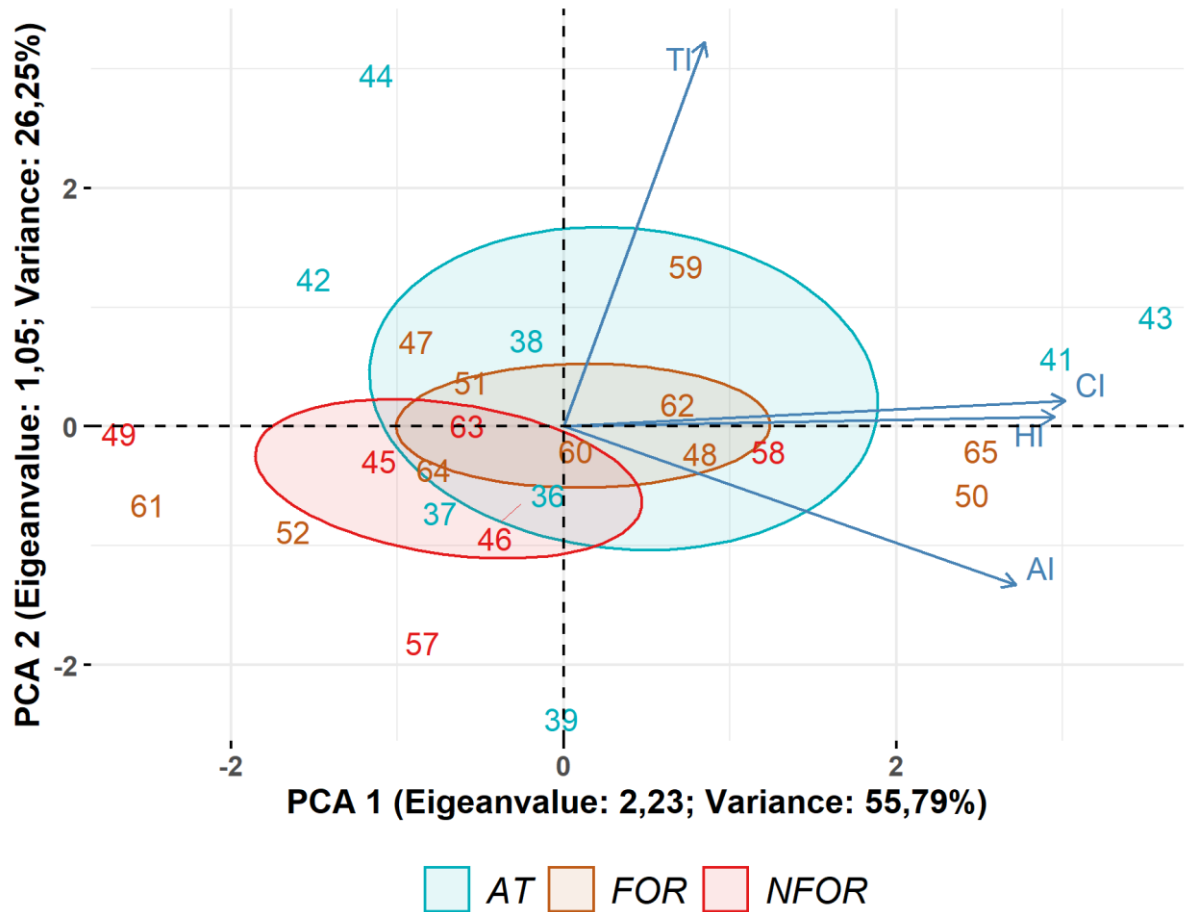


Figura 30. Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes principais dos 4 parâmetros ambientais em TMP-9 com elipses de confiança de 95% agrupadas pelos três grupos. CI, índice cardiosomático; AI, índice adrenossomático; TI, índice timossomático; HI, índice hepatossomático. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional.

6.9. Conteúdo das proteínas MCT1, MCT2 e CD 147 no músculo gastrocnêmio (porção branca)

O lactato atravessa a membrana plasmática por meio de proteínas de transporte específicas conhecidas como transportadores de monocarboxilatos (MCTs). Com relação aos MCTs do músculo gastrocnêmio branco, para a isoforma MCT1 não obtivemos diferença entre os grupos (**Figura 31A**). Já para isoforma MCT4 observou-se que o grupo NFOR expressou maior quantidade desta proteína em relação aos grupos FOR e AT (**Figura 31B**). Com relação a proteína auxiliar CD 147, esta foi expressa em três pesos moleculares diferentes (**Figura 32**), contudo apenas na isoforma de 57 kDa (**Figura 32B**) observou-se um aumento para grupo NFOR em relação ao grupo AT (**Tabela 11**).

Tabela 11. Análise descritiva e efeito do tratamento do conteúdo de proteínas MCT1, MCT4 e CD147 de ratos Wistar, machos, submetidos à condição de *overreaching*.

Variável	Tratamento	n	Média	DP	Min	Max	Tukey
MCT1	AT	7	0,06	0,04	0,01	0,11	a
	FOR	6	0,09	0,07	0,02	0,18	a
	NFOR	6	0,12	0,04	0,07	0,18	a
MCT4	AT	7	0,42	0,21	0,09	0,61	b
	FOR	6	0,42	0,14	0,2	0,62	b
	NFOR	6	0,69	0,1	0,51	0,78	a
CD147 (28 kDa)	AT	7	0,23	0,11	0,06	0,36	a
	FOR	7	0,22	0,11	0,09	0,38	a
	NFOR	7	0,26	0,1	0,12	0,37	a
CD147 (57 kDa)	AT	7	0,0036	0,0025	0,0003	0,0082	b
	FOR	6	0,0082	0,0082	0,0004	0,0207	ab
	NFOR	6	0,0131	0,0069	0,0024	0,0234	a
CD147 (60 kDa)	AT	7	0,0050	0,0056	0,0010	0,0164	a
	FOR	7	0,0095	0,0113	0,0010	0,0325	a
	NFOR	7	0,0268	0,0242	0,00008	0,0542	a

n: número de observações; DP: Desvio-padrão. Max: valor máximo; Min: valor mínimo; Tukey: considerando diferença significativa ($P < 0,05$).

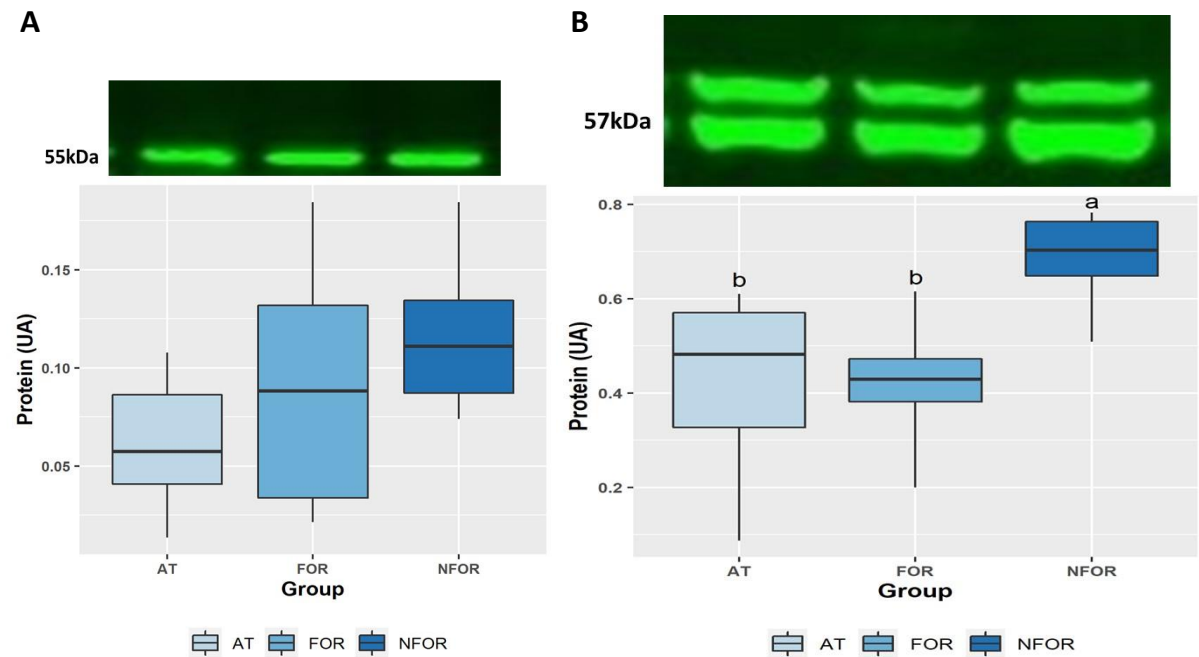


Figura 31. A: Imagem e gráfico de *Western Blotting* da proteína transportadora de monocarboxilato 1 (MCT1 – 55 kDa) nos diferentes tratamentos. B: Imagem e gráfico de *Western Blotting* da proteína transportadora de monocarboxilato 4 (MCT4 – 57 kDa) nos diferentes tratamentos. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional.

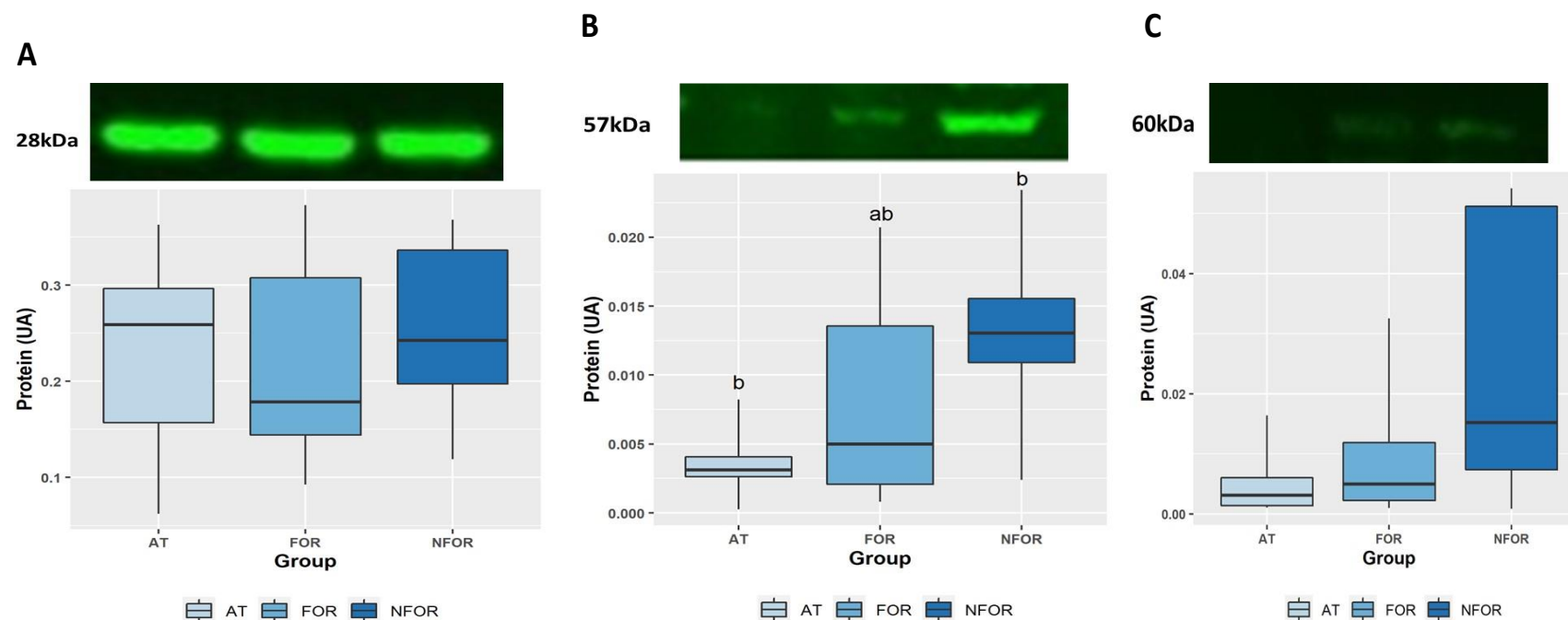


Figura 32. Imagem e gráfico de *Western Blotting* da proteína CD 147 (28 kDa) nos diferentes tratamentos. B: Imagem e gráfico de *Western Blotting* da proteína CD 147 (57 kDa) nos diferentes tratamentos. C: Imagem e gráfico de *Western Blotting* da proteína CD 147 (60 kDa) nos diferentes tratamentos. AT, ativo; FOR, *overreaching* funcional; NFOR, *overreaching* não funcional

7. DISCUSSÃO

No presente estudo apresentamos achados relacionados com indicadores musculares, bioquímicos, comportamentais e somáticos de ratos Wistar sobre as condições FOR e NFOR. Vale ressaltar que o hormônio corticosterona, bem como as variáveis de comportamento, lactato e MCTs apresentadas na presente pesquisa são inéditas para ratos nestas condições. Para tanto, nós utilizamos um protocolo de *overtraining* previamente elaborado (Hohl et al., 2009), o qual provocou em ratos submetidos a intensidades incrementais e reduções no período de recuperação, as condições de FOR e NFOR.

Uma variável importante e consistente nas condições NFOR/SOT é a massa corpórea, sendo que reduções são apontadas como um dos sintomas destas condições em atletas humanos. A redução de massa corpórea observada em FOR e NFOR em comparação ao AT durante o PO estão de acordo com dados publicados anteriormente (Hohl et al., 2009; Pereira et al., 2012; Pereira et al., 2015). Como sugerido no estudo de Hohl e colaboradores (Hohl et al., 2009), que também observaram redução do MC em ambos os grupos durante o protocolo, esta redução pode estar relacionada ao hipermetabolismo e proteólise promovidos pela intensificação do exercício. Contudo no presente estudo, NFOR demonstrou redução persistente da MC, que se manteve até TMP-8, correspondente a primeira semana de recuperação passiva, sendo sua MC menor que a MC encontrado para o grupo AT. A redução nas MCs de ambos os grupos pode indicar que eles se encontravam sobre marcante estresse catabólico (Hohl et al., 2009). Também, glicocorticóides, quando liberados em condição de estresse causam aumento da proteólise, induzindo perda de massa corporal (Hohl et al., 2009).

Uma atenção especial tem sido dedicada à influência da atividade física sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), o qual exerce função chave quando se diz respeito a resposta gerada pelo organismo frente ao estresse (Lalanza et al., 2012). No presente trabalho, os resultados obtidos para as quantificações de corticosterona demonstraram redução das concentrações em todos os grupos em TMP-7 e aumento em TMP-9 quando comparado ao TMP-7. Estudos com roedores relataram redução

de desempenho acompanhado de aumento das concentrações de corticosterona em indivíduos do grupo NFOR (Lira et al., 2010), aumento da corticosterona durante treinamento de intervalo de alta intensidade (de Araújo et al., 2016). Em estudo com roedores em OT, foi observado aumento nas concentrações séricas de corticosterona para o grupo OT quando comparados ao grupo controle (de Rocha et al., 2017). É importante ressaltar que nem sempre são observados aumentos nas concentrações deste glicocorticóide na SOT (Halsen e Jeukendrup, 2004) e que os resultados descritos na literatura são bastante controversos. Estudo com corrida voluntária em roedores detectou elevações nas concentrações de corticosterona de repouso durante a primeira semana após os animais serem submetidos a atividade física, sendo que houve normalização destes valores após 4 ou 8 semanas de treino (Campbell et al., 2009). Deste modo, este resultado pode ser uma explicação para a não diferença entre os grupos FOR e NFOR nos momentos TMP-7 e 9 em nosso trabalho, revelando que a corticosterona pode ter sido alterada durante o protocolo de *overtraining*, no entanto possivelmente seus valores se normalizaram após algumas semanas de treino. Suportando esta hipótese, outro estudo com ratos revelou que a análise das concentrações deste hormônio não diferiu entre os grupos treinados (Lanza et al., 2012). Ou seja, mudanças ao longo do tempo na intensidade e mesmo no volume do treinamento podem promover mudanças transitórias nas concentrações hormonais, transmitindo informações sobre o estado de recuperação e os estados atuais de estresse (Stone et al., 2017).

Sabe-se que a redução da aptidão física é, ainda hoje, a única variável bem estabelecida na literatura que está relacionada com as condições NFOR/SOT (Meeusen et al., 2013; Grandrou et al., 2020), sendo considerada como padrão ouro no diagnóstico desta condição em testes de desempenho realizados até a exaustão (Hohl et al., 2009). Dentro deste contexto, a dinâmica dos desempenhos obtidos para FOR e NFOR indicou, que numa população de roedores, alguns indivíduos responderam satisfatoriamente ao incremento de intensidade, frequência e volume do treinamento, enquanto outros sofreram redução no desempenho atlético. Ou seja, o protocolo previamente elaborado ao qual os ratos foram submetidos (Hohl et al., 2009) mostrou-se novamente sua reprodutibilidade em relação a separação de dois grupos de ratos com desempenhos diferentes ao final do PO (Moranza, 2017).

A redução persistente da performance observada na condição NFOR em TMP-7 foi notória, sendo que os valores de desempenho não retornaram aos anteriormente atingidos nos TMP-3, 4, 5 e 6. Esta redução se manteve no período de recuperação passiva. Este achado corroborou os resultados encontrados em estudos previamente realizados em ratos e camundongos (Hohl et al, 2009; Pereira et al., 2012; da Rocha et al., 2015), que revelaram redução persistente do desempenho no grupo NFOR.

O percentual alto (75%) de ratos corredores obtidos no início do experimento, pode ser explicado a partir da comparação entre os delineamentos experimentais de outros estudos. No presente estudo, todos os ratos tiveram maior período de adaptação, ou seja, uma semana a mais em relação ao protocolo de Hohl et al. (Hohl et al., 2009) e duas semanas a mais em relação ao utilizado por Pereira et al. (Pereira et al., 2012). Vale ressaltar que existem protocolos que utilizam corrida em declive (Pereira et al., 2012; da Rocha et al., 2017), os quais induzem *overtraining* em 100% dos indivíduos. Contudo, no presente estudo a intenção foi mimetizar uma população de atletas, onde todos são submetidos ao mesmo protocolo e respondem aos incrementos impostos de acordo com a individualidade de cada organismo.

Os resultados dos biomarcadores obtidos nesse estudo refletem respostas agudas ao protocolo de *overtraining* ao qual os animais foram submetidos, visto que que as amostras biológicas foram processadas imediatamente após o teste de exaustão. Nestas condições a enzima citrato sintase não diferiu entre os grupos, ou seja, não observamos associação na redução da capacidade oxidativa do músculo gastrocnêmio vermelho com reduções no desempenho do grupo NFOR. Por outro lado, trabalhos anteriores mostraram que a atividade sérica da citrato sintase se apresentou reduzida no grupo NFOR e aumentada no grupo FOR (Hohl et al., 2009; Ferraresso et al., 2012). No entanto, em programas de treinos intensos relativamente prolongados, enzimas musculares podem apresentar elevações intramuscular (Stone et al., 2017) ou mesmo não se alterarem, levando autores a sugerir que um tempo pós-treino pode ser necessário para avaliar os danos associados ao estado de competição ao usar a creatina quinase e outros marcadores biomoleculares (Stone et al., 2017). Assim, um período pós-treino mais prolongado tem sido proposto para avaliar os danos (Stone et al., 2017).

O glicogênio é um polímero multiramificado de moléculas de glicose que tem por função o armazenamento de energia (Cheng et al., 2020). É encontrado numa variedade de tecidos, sendo quantitativamente elevados nos músculos esqueléticos e no fígado (Cheng et al., 2020). Nestas condições, observamos que as concentrações de glicogênio do músculo sóleo encontrou-se reduzida para FOR e NFOR em comparação com AT em ambos os momentos (TMP-7 e TMP-9). Para o músculo gastrocnêmio medial observou-se uma redução de glicogênio do grupo NFOR em relação ao AT. NO músculo gastrocnêmio lateral, em TMP-9, observou-se reduções das concentrações de glicogênio de FOR e NFOR em relação ao AT bem como reduções de ambos os grupos de TMP-7 para TMP-9. Para o músculo semimenbranáceo observou-se em TMP-7 redução em relação ao TMP-9 para todos os grupos. Para o fígado, apesar de em TMP-7, FOR e NFOR apresentarem maiores concentrações de glicogênio, observou-se que ambos os grupos depletaram glicogênio de TMP-7 para TMP-9. Estes achados podem demonstrar que houve uma depleção nas concentrações de glicogênio muscular e hepático em ambos os grupos, sendo possível que este seja uma das variáveis responsáveis pela redução de desempenho observada no grupo NFOR, não descartando a hipótese da redução dos estoques de glicogênio muscular como uma das causas subjacentes da redução da performance. Desta maneira, a depleção de glicogênio intramuscular pode ser um contribuinte significativo para a fadiga e recuperação pós-exercício prejudicada do grupo NFOR, ademais sabe-se que a taxa de ressíntese de glicogênio muscular é lenta e leva de horas a vários dias para se restaurar por completo (Cheng et al., 2020). Por outro lado, estudo com roedores submetidos as condições de FOR e NFOR demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos (Hohl et al., 2009).

Vale ressaltar que o padrão diferente de respostas de diferentes músculos esqueléticos está associado ao padrão de fibras musculares que os mesmos são constituídos por populações mistas de fibras musculares brancas ou vermelhas (Close, 1972). A exemplo temos predomínio de contração lenta no sóleo; gastrocnêmio medial possui fibras mosaico e gastrocnêmio lateral predomínio de fibras de contração rápida (Tipo II), alta potência, mas que fadigam rapidamente.

As fibras podem ser classificadas em três grupos principais: fibras de contração lenta, oxidativa (TIPO I ou vermelhas), a qual possui baixo nível de enzimas

glicolíticas, diâmetro pequeno, moderado a elevado grau da capacidade aeróbia (Peter et al., 1972, Berne et al., 2004; Paixão, 2011); Fibras de contração rápida, oxidativa e glicolítica (TIPO IIA ou brancas): atividade aeróbia moderada a alta, diâmetro intermediário contendo elevada concentração de enzimas oxidativas (Peter et al., 1972, Berne et al., 2004, Paixão, 2011); contração rápida, glicolítica (TIPO IIB ou brancas): com alta concentração de glicogênio, diâmetro maior e baixa atividade enzimática oxidativa (Peter et al., 1972, Berne et al., 2004, Paixão, 2011).

A dinâmica das concentrações de lactato é considerada indicador adequado de esforço anaeróbio e da aptidão física dos atletas. No meio esportivo, reduções nas concentrações de lactato durante exercícios de intensidades submáxima e máxima são associados a melhorias na aptidão física do indivíduo. Contudo, no *overtraining*, já foram observadas reduções nas concentrações de lactato submáximas e máximas (Borresen et al., 2009). A exemplo disso, Jeukendrup e Hesselink (1994) demonstraram em ciclistas, redução nas concentrações máximas e submáximas de lactato em conjunto com a redução do desempenho e queixas de irritabilidade e distúrbios do sono, sendo diagnosticado *overtraining*. Este achado elucida a importância da avaliação cuidadosa das concentrações de lactato, pois a diminuição paradoxal nas [lac] plasmático em testes submáximos e máximos são considerados marcadores de NFOR/SOT (Meeusen et al., 2010). Neste estudo, observamos redução da [lac] máximas no momento TMP-2 para grupo FOR e no TMP-6 para ambos os grupos (FOR e NFOR). O motivo desta queda no lactato plasmático ainda não está claro, mas especula-se que esta redução no grupo NFOR pode estar relacionada a reduções nas concentrações de glicogênio muscular após sessões de exercícios extenuantes, diminuição da resposta simpática ou na produção e na ação das catecolaminas sobre as fibras musculares (Gleeson, 2002).

Sabe-se que as catecolaminas exercem importante função regulatória na glicogenólise, desta maneira, sua redução pode causar diminuição da produção de lactato (Jeukendrup e Hesselink, 1994). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Meeusen et al. (Meeusen et al., 2013) e Jeukendrup e Hesselink (1994), que encontraram que de maneira geral, atletas humanos de resistência que apresentam NFOR/SOT, redução nas concentrações submáxima e máxima de lactato. Em exercícios de intensidade moderada a intensa, o carboidrato é o principal

substrato energético envolvido, sendo este estocado sob a forma de glicogênio no músculo que durante a atividade física é rapidamente depletado, sendo que em níveis críticos, sua depleção está associada à fadiga, sendo que esta depleção de glicogênio durante o exercício parece possuir influências tanto nas concentrações plasmáticas de glicose e lactato (Conlee et al., 1987), ou seja, a depleção de glicogênio encontrada no presente trabalho pode ser responsável pelas reduções nas concentrações de lactato.

Tendo em vista que os músculos esqueléticos consomem e produzem lactato, o qual é transportado pelos MCTs (Transportadores de Monocarboxilatos), outra hipótese para redução nas [lac] na condição NFOR pode estar relacionada a alteração nas concentrações destes transportadores, já que é sabido que a expressão dos MCTs pode ser modulada de acordo com os desafios metabólicos impostos por diferentes protocolos de exercício (Scariot et al., 2016). Sabe-se que a isoforma MCT1 é responsável pelo influxo de lactato, enquanto o MCT4 auxilia na extrusão de lactato. Neste contexto, o treinamento aumentou a expressão da isoforma MCT1 no músculo sóleo de ratos treinados, aumentando a capacidade de remoção do lactato do sangue (Scariot et al., 2016). Dentro deste contexto, nosso protocolo de overtraining foi capaz de modular a expressão destes transportadores, aumentando a expressão da isoforma MCT4 na musculatura esquelética em indivíduos NFOR, promovendo possivelmente a maior concentração de lactato em relação ao grupo FOR no momento TMP-6. O lactato é liberado das fibras glicolíticas via MCT4 e, em seguida, absorvido pelas fibras oxidativas via MCT1 (Brooks, 2009). Pesquisas humanas e roedores demonstraram que a expressão de MCT1 aumentou após o treinamento contínuo de baixa intensidade e alta intensidade, por outro lado, para aumentar a expressão da isoforma MCT4, o treinamento de alta intensidade seguido por um aumento na concentração de lactato foi necessário (Thomas et al., 2012; Yoshida et al., 2004). Kitaoka et al. (2011) demonstraram que o treinamento de alta intensidade foi necessário para manter o nível de proteína MCT4 em cavalos treinados acima de 90% da $\dot{V}O_2$. No entanto, estudos adicionais com outros músculos devem ser realizados para obter informações sobre os mecanismos das concentrações reduzidas de lactato em conjunto com a expressão dos transportadores monocarboxilatos em ratos nas condições FOR e NFOR.

Com relação a proteína auxiliar CD 147, esta foi expressa em três pesos moleculares diferentes (28, 57 e 60 kDa), contudo apenas na isoforma de 57 kDa (**Figura 32B**) observou-se um aumento para grupo NFOR em relação ao grupo AT. O peso molecular de CD147 varia entre 31 e 65 kDa dependendo do grau de glicosilação, contudo, o mecanismo subjacente ao efeito da glicosilação na regulação da função de CD 147 ainda precisa ser totalmente elucidado (Liu et al., 2019). Em estudo com câncer epitelial de ovário, Liu e colaboradores (2019) encontraram uma isoforma da proteína CD 147 de 26 kDa.

Com relação aos resultados obtidos para as concentrações de glicose nos testes máximos, obtivemos no momento TMP-6 o grupo FOR demonstrou menor glicemia em relação ao grupo AT. Com relação as reduções de glicemia nos grupos FOR e NFOR em TMP-6, estudo com ratos submetidos a treinamento moderado mostrou redução da glicemia quando comparado aos grupos controle e sedentário, sendo que a literatura revela que ratos em treinamento apresentaram concentrações reduzidas de triglicerídeos, colesterol e glicose em repouso quando comparado aos outros grupos (Lalanza et al., 2012).

Pouco se sabe sobre a influência do exercício sobre o comportamento em modelos animais, em especial nas condições FOR e NFOR. Para o nosso conhecimento, não houve estudos em roedores sobre a influência das condições FOR e NFOR sob as alterações comportamentais. Embora à análise estatística não tenha evidenciado diferença entre os grupos para a maioria das variáveis comportamentais quantificadas, numa avaliação descritiva do comportamento destas para os três grupos experimentais, a ACP evidenciou uma distribuição oposta e bem marcada entre FOR e NFOR. Considerando a necessidade de marcadores eficazes para diferenciar estas duas condições, este tipo de análise mostrou-se promissora, uma vez que permite a correlação de variáveis ou grupo de variáveis. Na **Figura 23** está apresentado o comportamento descritivo das variáveis do CA, sendo que os dois componentes principais foram responsáveis por 63,48% de toda variância observada. A disposição gráfica das variáveis para os grupos evidenciou separação do grupo AT dos grupos FOR e NFOR. Quanto ao LCE, os dois componentes principais foram responsáveis por 94,1% da variância observada. Contudo, a disposição gráfica das variáveis não evidenciou separação entre os grupos.

Com relação aos índices somáticos, ao todo, a **Figura 29** contém 72,22% da variação dos dados e a **figura 30** detém 82,04% da variação dos dados. Vale ressaltar que grande parte da variância total é explicada por apenas 2 eixos da ACP. Ademais, a disposição gráfica das variáveis para os grupos evidenciou separação bem definida dos grupos em AT, FOR e NFOR no momento TMP-7.

Por fim, os principais achados comprovaram a reprodutibilidade do protocolo que provocou em ratos submetidos a intensidades incrementais, as condições de FOR e NFOR, as quais não foram capazes de provocar alterações significativas na capacidade oxidativa do músculo gastrocnêmio vermelho por meio da atividade enzimática da citrato sintase. Ademais, observamos de maneira geral uma depleção no conteúdo de glicogênio muscular e hepático dos animais. As análises de ACPs tanto comportamentais quanto de índice somáticos se mostraram promissoras na identificação e separação dos grupos FOR e NFOR na presente tese. Considerando que o NFOR/SOT foi capaz de reduzir as concentrações de lactato e que a atividade física pode modular a expressão dos MCTs, o grupo NFOR apresentou maior conteúdo proteico em relação a proteína MCT4, responsável pelo efluxo de lactato do músculo.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que o protocolo de *overtraining* utilizado induziu reduções nas concentrações de MCT4 no grupo NFOR. Nos testes máximos e submáximos, obtivemos reduções nas concentrações de lactato e redução nas concentrações glicose em TMP-6. Ademais, observou-se depleção de glicogênio em uma análise geral. Tais resultados demonstram a importância da avaliação do lactato submáximo e máximo em conjunto com a determinação do conteúdo proteico de transportadores de monocarboxilatos musculares. A análise de ACPs tanto comportamentais quanto de índice somáticos se mostraram eficazes e promissoras na identificação e separação dos grupos FOR e NFOR.

9. REFERÊNCIAS

Adlercreutz, H.; Härkönen, M.; Kuoppasalmi, K.; Näveri, H.; Huhtaniemi, I.; Tikkanen, H.; Karvonen, J. Effect of training on plasma anabolic and catabolic steroid hormones and their response during physical exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v. 7, n. 1, p. 27-28, 1986.

Alves, R. N.; Costa, L. O. P.; Samulski, D. M. Monitoramento e prevenção do supertreinamento em atletas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 5, p. 291-296, 2006.

Araújo, G. G.; Gobatto, C. A.; Hirata, R. D. C.; Hirata, M. H.; Cavaglieri, C. R.; Verlengia, R. Respostas fisiológicas para detectar o *overtraining*. **Journal of Physical Education**, v. 19, n. 2, p. 275-289, 2008.

Aubry, A.; Hausswirth, C.; Louis, J.; Coutts, A. J.; Buchheit, M.; Le meur, Y. The development of functional overreaching is associated with a faster heart rate recovery in endurance athletes. **Plos one**, v. 10, n. 10, p. e0139754, 2015.

Barron, J. L.; Noakes, T. D.; Levy, W.; Smith, C.; Millar, R. P. Hypothalamic Dysfunction in Overtrained Athletes*. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 4, p. 803-806, 1985.

Beck, R. W.; Forte, M. L. D.; Gobatto, C. A. Efeitos do horário do dia, luminosidade ambiental e exercício físico sobre parâmetros inflamatórios e de performance em ratos nadadores. **Revista da Educação Física/UEM**, v. 26, n. 1, 2015.

Bergersen, L. H. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. **Neuroscience**, v. 145, n. 1, p. 11-19, 2007.

Bernardi, J.V.E.; Lacerda, L.D.; Dórea, J.G.; Landim, P.M.B.; Gomes, J.P.O.; Almeida, R.; Manzatto, A.G. Bastos, W.R. Aplicações da análise das componentes

principais na ordenação dos parâmetros físico-químicos no alto rio Madeira e afluentes, Amazônia Ocidental. **Geochimica Brasiliensis**, v. 23, n.1, p.079-090, 2009.

Berne, R. M.; Levy, M. N.; Koeppen, B. M. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 233p.

Birrer, D.; Lienhard, D.; Williams, C. A.; Röthlin, P.; Morgan, G. Prevalence of non-functional overreaching and the overtraining syndrome in swiss elite athletes. **Schweiz Z Sportmedizin Sporttraumatol**, V. 61, P. 23-29, 2013.

Bonifazi, M.; Sardella, F.; Luppo, C. Preparatory versus main competitions: differences in performances, lactate responses and pré-competition plasma cortisol concentration in elite male swimmers. **European Journal of Applied Physiology**, Heidelberg, v. 82, n. 5-6, p. 368-373, 2000.

Bosquet, L.; Leger, L.; Legros, P. Blood Lactate Response to *overtraining* in male athletes. **European Journal of Applied Physiology**, Heidelberg, v. 84, p.107-114, 2001.

Brooks, G. A. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. **Journal of Physiology**. v.587, p. 5591– 5600, 2009.

Burchfield, S. R. The stress response: A new perspective. **Psychosomatic Medicine**, 1979.

Cadegiani, F. A.; da Silva, P. H. L.; Abrao, T. C. P.; Kater, C. E. Diagnosis of overtraining syndrome: results of the endocrine and metabolic responses on overtraining syndrome study: EROS-DIAGNOSIS. **Journal of Sports Medicine**, v. 2020, 2020.

Cadegiani, F. A.; Kater, C. E. Inter-correlations among clinical, metabolic, and biochemical parameters and their predictive value in healthy and overtrained male

athletes: the EROS-CORRELATIONS study. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 858, 2019.

Campbell, J. E.; Rakhshani, N.; Fediuc, S.; Bruni, S.; Riddell, M. C. Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. **J Appl Physiol**. v.106, n. 1, p. 66-72, 2009.

Carfagno, D. G.; Hendrix, J. C. Overtraining syndrome in the athlete: current clinical practice. **Current sports medicine reports**, v. 13, n. 1, p. 45-51, 2014.

Carvalho, J. F.; Masuda, M. O.; Pompeu, F. A.M.S. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 140, n. 4, p. 409-413, 2005.

Champagne, D. L.; Bagot, R. C.; Van Hasselt, F.; Ramakers, G.; Meaney, M. J.; De Kloet, E. R.; Krugers, H. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 23, p. 6037-6045, 2008.

Cheng, A. J.; Jude, B.; Lanner, J. T. Intramuscular mechanisms of overtraining. **Redox Bioloy**, P. 101480, 2020.

Cheng, A. J.; Willis, S. J.; Zinner, C.; Chaillou, T.; Ivarsson, N.; Ørtenblad, N.; Westerblad, H. Post-exercise recovery of contractile function and endurance in humans and mice is accelerated by heating and slowed by cooling skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 24, p. 7413-7426, 2017.

Contarteze, R. V. L.; Manchado, F. D. B.; Gobatto, C. A.; Mello, M. A. R. D. Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 3, p. 169-74, 2007.

Cunha, G. D. S.; Ribeiro, J. L.; Oliveira, A. R. D. Sobretraining: teorias, diagnóstico e marcadores. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 5, p. 297-302, 2006.

da Rocha, A. L.; Pereira, B. C.; Pauli, J. R.; Cintra, D. E.; de Souza, C. T.; Ropelle, E. R.; da Silva, A. S. Downhill running-based overtraining protocol improves hepatic insulin signaling pathway without concomitant decrease of inflammatory proteins. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140020, 2015.

da Rocha, A. L.; Pereira, B. C.; Teixeira, G. R.; Pinto, A. P.; Frantz, F. G.; Elias, L. L.; da Silva, A. S. Treadmill slope modulates inflammation, fiber type composition, androgen, and glucocorticoid receptors in the skeletal muscle of overtrained mice. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1378, 2017.

de Araujo, G. G.; Papoti, M.; Dos Reis, I. G. M.; de Mello, M. A.; Gobatto, C. A. Short and long term effects of high-intensity interval training on hormones, metabolites, antioxidant system, glycogen concentration, and aerobic performance adaptations in rats. **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 505, 2016.

De Kloet, E. R.; Karst, H.; Joëls, M. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 268-272, 2008.

Dias, P. R. F. **Relação entre estresse oxidativo, autofagia e apoptose nos estados for e nfor induzidos pelo protocolo de" overtraining"**. Dissertação de Mestrado – UNICAMP, Campinas, 2019.

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. T.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

Ernst, O.; Zor, T. Linearization of the Bradford protein assay. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 38, p. e1918, 2010.

Ferraresso, R. L. P.; De Oliveira, R. B.; Macedo, D. V.; Nunes, L. A. S.; Brenzikofer, R.; Damas, D.; Hohl, R. Interaction between overtraining and the interindividual variability may (not) trigger muscle oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in rats. *Oxid Med Cell Longev*. Hindawi Limited; 2012; 2012: 935483. **Biochim Biophys Acta**, v. 7, p. 1801-8, 1838.

Forte, L. D.; Rodrigues, N. A.; Cordeiro, A. V.; de Fante, T.; Simino, L. A.; Torsoni, A. S.; Manchado-Gobatto, F. B. Periodized versus non-periodized swimming training with equal total training load: Physiological, molecular and performance adaptations in Wistar rats. **Plos one**, v. 15, n. 9, p. e0239876, 2020.

Freitas, D. S.; Miranda, R.; Bara Filho, M. Marcadores psicológico, fisiológico e bioquímico para determinação dos efeitos da carga de treino e do *overtraining*. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 11, n. 4, p. 457- 465, 2009.

Frollini, A. B.; Dias, R.; Prestes, J.; Baganha, R. J.; Cereja, D. M. P.; Gomes, L. P. R.; Cavaglieri, C. R. Exercício físico e regulação do lactato: papel dos transportadores de monocarboxilato (proteínas mct). **Journal of Physical Education**, v. 19, n. 3, p. 453-463, 2008.

Gleeson, M. Biochemical and immunological markers of overtraining. **J Sports Sci Med**. v. 1, n. 2, p. 31-41, 2002.

Graaf-roelfsema, E.; Keizer, H. A.; Van Breda, E.; Wijnberg, I. D.; Van Der Kolk, J. H. Hormonal responses to acute exercise, training and overtraining a review with emphasis on the horse. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 3, p. 82-101, 2007.

Grandou, C.; Wallace, L.; Impellizzeri, F. M.; Allen, N. G.; Coutts, A. J. Overtraining in resistance exercise: an exploratory systematic review and methodological appraisal of the literature. **Sports Medicine**, v. 50, n. 4, p. 815-828, 2020.

Haaf, T.; Foster, C.; Meeusen, R.; Roelands, B., Piacentini, M. F., Van Staveren, S., De Koning, J. J. Submaximal heart rate seems inadequate to prescribe and monitor intensified training. **European Journal of Sport Science**, V. 19, N. 8, P. 1082-1091, 2019

Halestrap, A. P. The monocarboxylate transporter family—structure and functional characterization. **IUBMB life**, v. 64, n. 1, p. 1-9, 2012.

Halson, S.; Jeukendrup, A. Does *overtraining* exist? An analysis of overreaching and overtraining research. **Sports Med.** v. 34, n. 14, p. 967-981, 2004.

Hamlin, M. J.; Shearman, J. P.; Hopkins; W. G. Changes in physiological parameters in overtrained Standardbred racehorses. **Equine veterinary journal**, v. 34, n. 4, p. 383-388, 2002

Hohl, R.; Ferraresso, R. L.; De Oliveira, R. B.; Lucco, R.; Brenzikofer, R.; DE Macedo, D. V. Development and characterization of an *overtraining* animal model. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 5, p. 1155-63, 2009.

Hooper, S. L.; Mackinnon, L. T.; Gordon, R. D.; Bachmann, A. W. Hormonal responses of elite swimmers to *overtraining*. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Hagerstown, v. 25, p. 741-747, 1993.

Impellizzeri, F. M.; Marcora, S. M.; Coutts, A. J. Internal and external training load: 15 years on. **International journal of sports physiology and performance**, v. 14, n. 2, p. 270-273, 2019.

Jeukendrup, A.E; Hesselink, M.K. Overtraining--What do lactate curves tell us? **British Journal of Sports Medicine.** v.28, p.239-240, 1994.

Juel, C.; Halestrap, A. P. Lactate transport in skeletal muscle—role and regulation of the monocarboxylate transporter. **The Journal of physiology**, v. 517, n. 3, p. 633-642, 1999.

Kellmann, M. Underrecovery and *overtraining*. In: Enhancing recovery, preventing underperformance in athletes. Champaign (IL): **Human Kinetics**, 2002;1-24.

Kirwan, J. P.; Costill, D. L.; Mitchell, J. B.; Houmard, J. A.; Flynn, M. G.; Fink, W. J.; Beltz, J. D. Carbohydrate balance in competitive runners during successive days of intense training. **Journal of Applied Physiology**, v. 65, n. 6, p. 2601-2606, 1988.

Kitaoka, Y.; Masuda, H.; Mukai, K.; Hiraga, A.; Takemasa, T.; Hatta, H. Effect of training and detraining on monocarboxylate transporter MCT 1 and MCT4 in Thoroughbred horses. **Experimental Physiology**, v. 96 p. 348–355, 2011.

Kreher, J. B.; Schwartz, J. B. Overtraining syndrome a practical guide. **Sports health: a multidisciplinary approach**, v. 4, n. 2, p. 128-138, 2012.

Krustrup, P.; Ortenblad, N.; Nielsen, J.; Nybo, L.; Gunnarsson, T. P.; Iaia, F. M.; Bangsbo, J. Maximal voluntary contraction force, SR function and glycogen resynthesis during the first 72 h after a high-level competitive soccer game. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 12, p. 2987-2995, 2011.

Lalanza, J. F.; Sanchez-roige, S.; Gagliano, H.; Fuentes, S.; Bayod, S.; Camins, A.; Escorihuela, R. M. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 11, p. 1745-1754, 2012.

Leek, B. T.; Mudaliar, S. R.; Henry, R.; Mathieu-costello, O.; Richardson, R. S. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 2, p. R441-R447, 2001.

Lehmann, M.; Schnee, W.; Scheu, R.; Stockhausen, W.; Bachl, N. Decreased nocturnal catecholamine excretion: parameter for an overtraining syndrome in athletes? **International Journal of Sports Medicine**. v. 13, p. 236-242,1992.

Lewis, N. A.; Redgrave, A.; Homer, M.; Burden, R.; Martinson, W.; Moore, B.; Pedlar, C. R. Alterations in redox homeostasis during recovery from unexplained underperformance syndrome in an elite international rower. **International journal of sports physiology and performance**, v. 13, n. 1, p. 107-111, 2018.

Lira, F.S; Rosa, J.C; Pimentel, G.D. Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. **Lipids Health Dis.** v. 9, n. 1, p.1, 2010.

Liu, J.; Liu, Q.; Wang, Y.; Liu, M.; Qi, Y.; Gao, J.; Lin, B. Co-expression of Lewis y antigen and CD147 in epithelial ovarian cancer is correlated with malignant progression and poor prognosis. **International journal of molecular medicine**, v. 43, n. 4, p. 1687-1698, 2019.

Magistretti, P. J.; Allaman, I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 235, 2018.

Mcgowan, C. M.; Golland, L. C.; Evans, D. L.; Hodgson, D. R.; Rose, R. J. Effects of prolonged training, overtraining and detraining on skeletal muscle metabolites and enzymes. **Equine veterinary journal**, v. 34, n. S34, p. 257-263, 2002.

Mcgowan, C. M.; Whitworth, D. J. Overtraining syndrome in horses. **Comparative Exercise Physiology**, v. 5, n. 02, p. 57-65, 2008.

Meeusen, R.; Duclos, M.; Foster, C.; Fry, A.; Gleeson, M.; Nieman, D.; Raglin, J.; Rietjens, G.; Steinacker J.; Urhausen, A. Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 1, p. 186-205, 2013.

Moranza, H.G. **Treinamento e overtraining induziram alterações comportamentais e bioquímicas em ratos Wistar**. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, UNESP, Jaboticabal, 2017.

Morgan, W. P.; Brown, D. R.; Raglin, J. S.; O'connor, P. J.; ellickson, K. A. Psychological monitoring of overtraining and staleness. **British Journal of Sports Medicine**, v. 21, p.107-114. 1987.

Morton, J. P.; Kayani, A. C.; Mcardle, A.; Drust, B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. **Sports medicine**, v. 39, n. 8, p. 643-662, 2009.

Möstl, E.; Palme, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1, p. 67-74, 2002.

Mykkänen, A. K.; Pösö, A. R.; MCGOWAN, C. M.; MCKANE, S. A. Expression of lactate transporters MCT1, MCT2 and CD147 in the red blood cells of three horse breeds: Finnhorse, Standardbred and Thoroughbred. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 42, n. 38, p. 161-166, 2011

Myrick, K. M. Overtraining and overreaching syndrome in athletes. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 11, n. 10, p. 1018-1022, 2015.

Nikooie, R.; Rajabi, H.; Gharakhanlu, R.; Atabi, F.; Omidfar, K.; Aveseh, M.; Larijani, B. Exercise-induced changes of MCT1 in cardiac and skeletal muscles of diabetic rats induced by high-fat diet and STZ. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 865-877, 2013.

Nollet, M.; Wisden, W.; Franks, N. P. Sleep deprivation and stress: a reciprocal relationship. **Interface focus**, v. 10, n. 3, p. 20190092, 2020.

Ortenblad, N.; Nielsen, J. Muscle glycogen and cell function—location, location, location. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 25, p. 34-40, 2015.

Payen, V. L.; Mina, E.; Van Hée, V. F.; Porporato, P. E.; Sonveaux, P. Monocarboxylate transporters in cancer. **Molecular metabolism**, v. 33, p. 48-66, 2020.

Paixão, A. P. S. **Morfometria dos músculos sóleo e gastrocnêmio após imobilização na posição encurtada do membro pélvico de ratos, durante 15, 30 e 45 dias**. Dissertação de Mestrado –Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Pearson, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. **Philosophical Magazine**, v.2, p.559-572, 1901.

Pereira, B.C.; Lucas, G.; Da Rocha, A.L. Eccentric exercise leads to glial activation but not apoptosis in mice spinal cords. **International journal of sports medicine**. v.36, n.05, p. 378-385, 2015.

Pereira, B.C.; Luis Filho, A.L.; Alves, G.F. et al. A new overtraining protocol for mice based on downhill running sessions. **Clin Exp Pharmacol P**. v. 39, n. 90, p. 793-98, 2012.

Peter, J. B.; Barnard, R.; Edgerton, R.; Gillespie, C.; Stempel, K. Metabolic profiles of the three types of skeletal muscle fibers in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v.11, p.2627-33, 1972.

Proia, P.; Di Liegro, C. M.; Schiera, G.; Fricano, A.; Di Liegro, I. Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1450, 2016.

Rietjens, G. J. W. M.; Kuipers, H.; Adam, J. J.; Saris, W. H. M.; Van Breda, E.; Van Hamont, D. A.; Keizer, H. A. Physiological, biochemical and psychological markers of strenuous training-induced fatigue. **International Journal of Sports Medicine**, v. 26, n. 01, p. 16-26, 2005.

Rivero, J. L. L.; Breda, E. V.; Rogers, C. W.; Lindner, A.; Oldruitenborgh-oosterbaan, M. S. Unexplained underperformance syndrome in sport horses: classification, potential causes and recognition. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 6, p. 611-618, 2008.

Rohlfs, I. C. P. D. M.; Mara, L. S. D.; Lima, W. C. D.; Carvalho, T. D. Relação da síndrome do excesso de treinamento com estresse, fadiga e serotonina. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 6, p. 367-372, 2005.

Sakuragi, S.; Sugiyama, Y. Effects of daily walking on subjective symptoms, mood and autonomic nervous function. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 25, n. 4, p. 281-289, 2006.

Scariot, P.P.; de Barros Manchado-Gobatto, F.; Torsoni, A.S.; dos Reis, I.G.; Beck, W.R.; Gobatto, C.A. Continuous aerobic training in individualized intensity avoids spontaneous physical activity decline and improves MCT1 expression in oxidative muscle of swimming rats. **Front Physiol.** v.7, p.132, 2016.

Schwellnus, M.; Soligard, T.; Alonso, J. M.; Bahr, R.; Clarsen, B.; Dijkstra, H. P.; Van Rensburg, C. J. How much is too much?(Part 2) International Olympic Committee consensus statement on load in sport and risk of illness. **British journal of sports medicine**, v. 50, n. 17, p. 1043-1052, 2016.

Soligard, T.; Schwellnus, M.; Alonso, J. M.; Bahr, R.; Clarsen, B.; Dijkstra, H. P.; Van Rensburg, C. J. How much is too much ? (Part 1) International Olympic Committee consensus statement on load in sport and risk of injury. **British Journal of Sports Medicine**, v. 50, n. 17, p. 1030-1041, 2016.

Srere, P. A. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1969. p. 3-11.

Steiner, A. A.; Dogan, M. D.; Ivanov, A. I. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. **Faseb J.** v. 18, n.15, p. 1949-51, 2004.

Stone, J. D.; Kreutzer, A.; Mata, J. D.; Nystrom, M. G.; Jagim, A. R.; Jones, M. T.; Oliver, J. M. Changes in creatine kinase and hormones over the course of an American football season. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 33, n. 9, p. 2481-2487, 2019.

Takimoto, M.; Takeyama, M.; Hamada, T. Possible involvement of AMPK in acute exercise-induced expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 mRNA in fast-twitch skeletal muscle. **Metabolism**, v. 62, n. 11, p. 1633-1640, 2013.

Thomas, C.; Bishop, D. J.; Lambert, K.; Mercier, J.; Brooks, G. A. Effects of acute and chronic exercise on sarcolemmal MCT1 and MCT4 contents in human skeletal muscles: Current status. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 302, p. R1– R14, 2012.

Urhausen, A.; Gabriel, H.; Kindermann, W. Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Hagerstown, v. 30, p. 407-414, 1998.

Yoshida, Y.; Hatta, H.; Kato, M.; Enoki, T.; Kato, H.; Bonen, A. Relationship between skeletal muscle MCT1 and accumulated exercise during voluntary wheel running. **Journal of Applied Physiology**. v.97, p. 527– 534, 2004.

Zoppi, C. C.; Macedo, D. V. Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 18, n. 1, p. 67-76, 2008.