

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

***OVERREACHING/OVERTRAINING* DE RATOS WISTAR:
RESPOSTA INFLAMATÓRIA, MICROBIOTA INTESTINAL E
COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA COM EQUINOS**

Maria Luiza Mendes de Almeida
Tecnóloga em Biocombustíveis

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***OVERREACHING/OVERTRAINING* DE RATOS WISTAR:
RESPOSTA INFLAMATÓRIA, MICROBIOTA INTESTINAL E
COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA COM EQUINOS**

Maria Luiza Mendes de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

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

A447o	Almeida, Maria Luiza Mendes de Overreaching/overtraining de ratos Wistar: resposta inflamatória, microbiota intestinal e comparação da abundância relativa com equinos / Maria Luiza Mendes de Almeida. -- Jaboticabal, 2020 108 p. : tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos 1. Micro-organismos. 2. Exercícios físicos. 3. Microbiota. 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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: OVERREACHING/OVERTRAINING DE RATOS WISTAR: RESPOSTA INFLAMATÓRIA, MICROBIOTA INTESTINAL E COMPARAÇÃO DA ABUDÂNCIA RELATIVA COM EQUINOS

AUTORA: MARIA LUIZA MENDES DE ALMEIDA

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

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

p/ *Eliana Gertrudes de Macedo Lemos*

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

p/ *Eliana Gertrudes de Macedo Lemos*

Pós-doutoranda MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

p/ *Eliana Gertrudes de Macedo Lemos*

Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO (Participação Virtual)
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

p/ *Eliana Gertrudes de Macedo Lemos*

Profa. Dra. GESIANE RIBEIRO LEÃO FERRAZ (Participação Virtual)
Faculdades Metropolitanas Unidas / São Paulo/SP

p/ *Eliana Gertrudes de Macedo Lemos*

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

Jaboticabal, 27 de novembro de 2020

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal
Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

O projeto intitulado "Análise da microbiota cecal utilizando ratos Wistar como modelo do overtraining", sob responsabilidade da Profa Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, Protocolo 23593/15. A indução de síndromes ou enfermidades experimentais em cavalos é questionada pela legislação atual. Com base na Lei nº. 11.794/2008 e na Normativa 2015 do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, ratos Wistar são alternativa à utilização de cavalos devido ao seu rápido ciclo de vida e menor grau de invasividade na referida proposta de trabalho. Além disso, representam excelente modelo biológico na medicina translacional e proporcionam respostas microbiológicas e morfofisiológicas com elevado grau de confiança permitindo a repetibilidade de protocolos experimentais. Desta forma, declaramos, para devidos fins, que a espécie equina não seria aprovada como modelo animal no projeto supracitado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo a presente

Jaboticabal, 30 de novembro de 2016



Prof. Dr. Lizandra Amoroso
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal

Prof. Dr. Lizandra Amoroso
Médica Veterinária
CRMV 18.510

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Maria Luiza Mendes de Almeida – Nascida na cidade de Diadema – SP, 04 de julho de 1974. Tecnóloga em Biocombustível, graduada pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal – FATEC JB, na cidade de Jaboticabal - SP, com início em fevereiro de 2009 e término em dezembro de 2011. Durante a graduação, realizou iniciação científica com bolsa da FAPESP, no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, no período de 2010 a 2011 sob orientação da Profa. Dra. Lucia Carareto Alves. Recebeu certificado de menção honrosa pelo trabalho de graduação intitulado: “Diversidade Bacteriana de um Consórcio Degradador de Celulose”. Em 05 de agosto de 2013, ingressou no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e co-orientação do Prof. Dr. Marcio Costa da Universidade de Ghelph, Canadá, como bolsista FAPESP. Atualmente é Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - Câmpus Jaboticabal sob orientação do Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos. Em setembro de 2020 Maria Luiza submeteu este exemplar para defesa da Tese para obtenção do título de Doutora.

Dedico,

A Deus e toda a espiritualidade, a todos os seres vivos!

A minha família que durante essa pandemia aprendeu mais ainda que o respeito e o amor incondicional são fundamentais para qualquer relação saudável. Meus filhos; Vitor

e Maria, minha gratidão eterna por nessa vida ter sido escolhida para ser a mãe de vocês!! Meu marido, Guilherme, pessoa de poucas palavras, mas de coração enorme.

Minha norinha, Amanda, que veio para somar nessa família buscapé, dona de um sorriso gostoso, parceira na vida e no laboratório. Por último, nosso grande diamante:

Manuela! Minha netinha que nos ensina todos os dias como podemos ser ecléticos, como podemos ver a vida de uma forma simples e fácil. Meu amor e gratidão não tem tamanho por todos vocês!

Dedico,

Ao meu grande amigo que a vida me presenteou, Ricardo Marcondes, que durante os últimos meses, se mostrou presente diariamente em nossas vidas. Com voz calma e palavras acertivas, me ensinou na prática, que a racionalidade e paciência são grandes aliadas para nossas conquistas. Gratidão enorme pela nossa amizade infinita!

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Zahiro e Lidia, cada dia que passa meu amor e admiração por vocês só aumenta!

A minha comadre, amiga, mãe, irmã: Fátima Vasquez (Didi), obrigada por sempre estar presente na minha vida e na vida dos meus filhos!

A Gitika, pelo carinho e ajuda de sempre. Obrigada por todo o apoio!

A minha irmã mais linda desse mundo, Bi Santinha, amor e amizade para uma vida inteira!

Aos meus sobrinhos mais amados, Luiza e Chico. Luiza um doce e o Chico um chato com a tia mais linda e mais legal desse mundo: EU!

Ao meu psiquiatra Dr Alcides por me acompanhar durante anos nessa trajetória, me ouvindo, me ensinando, me mestrando que tem momentos que é desafiador mesmo. Seu apoio foi fundamental para que eu finalizasse mais essa etapa. Obrigada por tudo!!

Ao meu amigo Walter, por toda a jornada comigo. Meu melhor e mais fiel amigo. Juntos em experimento, juntos na bancada, juntos na academia, juntos sempre!

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP**, principalmente ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, o Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino e o setor de Eqüinocultura.

A minha orientadora Profa. Dra. **Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**, pela confiança, respeito e dedicação nesse meu aprendizado.

Ao Prof. Daniel Pinheiro e a aluna Michelli Funnicelli do Laboratório de Bioinformática por toda a dedicação. Vocês foram fundamentais para que chegássemos até aqui. Acreditaram no projeto e fizeram de maneira extremamente profissional todas as análises. Nosso muito obrigada e que esse seja o primeiro trabalho de uma longa parceria.

A todos os funcionários da sessão de pós graduação, que sempre com muita paciência, nos informam, nos cobram e precisam mediar a árdua tarefa de manter discentes e docentes em equilíbrio para que tudo funcione de maneira perfeita. Em especial a Marcia, que nos primeiros meses dessa pandemia me ajudou muito me orientando com muito carinho sempre!

Aos colegas do LBMP, em especial o João Carlos, que fazem o nosso laboratório pulsar vida, seja com experimentos, risadas, fofocas...tudo de bom de uma família cientista maluca!

Ao amigo Dêco, por sua paciência e sabedoria de lidar com os animais. Aprendi muita coisa com você, obrigadaaaa!!!!

Ao conselho de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, pela dedicação a todos os alunos do programa.

A todos os professores da FCAV, muito obrigado. Em especial ao Prof. Pablo que mesmo enfrentando uma doença chata, sempre esteve presente na sala de aula, ensinando, conversando, alegrando todos os alunos. Você é um grande exemplo para mim!

A equipe do laboratório LAFEQ, por toda dedicação durante todos esses meses de experimento, foram meses e meses trancados no biotério entrando em overtraining.

Ao Haras da Esperança e ao Haras Grande Sertão pelas potras cedidas gentilmente para a realização dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do projeto (Projeto auxílio 2015/26738-1).

Ao CNPq por parte do financiamento do projeto.

A Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador pelos recursos utilizados na execução dessa pesquisa.

Por último, não menos importante, meu muito obrigada por todos as pessoas que passaram por mim durante minha história na FCAV.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
OBJETIVOS.....	11
REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE OVERTRAINING	
RESUMO.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS.....	38
DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO 3 – TREINAMENTO AERÓBIO PARA INDUÇÃO DE OVERREACHING/OVERTRAINING MODIFICOU A MICROBIOTA CECAL DE RATOS WISTAR	
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	67
DISCUSSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	82
CAPÍTULO - 4 COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS E EQUINOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO INTENSO	
INTRODUÇÃO.....	89
MATERIAL E MÉTODOS.....	91
RESULTADOS.....	98
DISCUSSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2- AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE OVERTRAINING

Figura 1. Esteira motorizada para roedores. Fase de adaptação.....30

Figura 2. Fluxograma do experimento. Seta: seleção antes do treinamento; Linhas com círculo: seleção após TMP-1; Linha tracejada: final do protocolo; Linha pontilhada: ratos submetidos a eutanásia para coleta da mucosa do íleo e cólon. SED, grupo sedentário; SSED, grupo semi-sedentário; TR, grupo treinado; FOR, overreaching funcional; NFOR, overreaching não funcional; P, desempenho (kg.m).....33

Figura 3. Exemplo do estabelecimento dos grupos FOR e NFOR. A: representação do SSED; B: representação do FOR; C: representação do NFOR.....34

Figura 4. Histograma de distribuição dos grupos; Overreaching não funcional (NFOR, n=14) e Overreaching funcional (FOR, n=19). Seta: Indica o α crítico de -0,98 kg.m utilizado para classificação dos grupos experimentais.....36

Figura 5. Desempenhos dos ratos durante o período experimental. Observar as linhas de tendências quadráticas SSED: $Y = -1,194x^2 + 22,08x + 130,04$ ($r^2=0,70$); FOR: $-26,04x^2 + 237,22x - 44,985$ ($r^2=0,75$); NFOR: $Y = -11,17x^2 + 157,42 - 4,4506$ ($r^2=0,98$). SSED = grupo controle; FOR = grupo Overreaching funcional; NFOR = grupo não funcional overreaching.....39

Figura 6. TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10 ileal de ratos submetidos à indução das condições FOR e NFOR * Indica redução do grupo NFOR em relação ao grupo sedentário. # Indica redução do grupo FOR em relação ao grupo sedentário, pelo teste Tukey ($P < 0.05$).....40

Figura 7. TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10 colônica de ratos submetidos à indução das condições FOR e NFOR.....40

Figura 8. Distância na região das Tight Junctions e na região das Junções Aderentes no Íleo e Cólon de ratos submetidos à indução das condições FOR e NFOR.....42

CAPÍTULO 3 – TREINAMENTO AERÓBIO PARA INDUÇÃO DE OVERREACHING/OVERTRAINING MODIFICOU A MICROBIOTA CECAL DE RATOS WISTAR

Figura 1. Fluxograma do protocolo experimental. SSED= semi-sedentário, realizou condicionamento moderado; TR=grupo treinado, ratos submetidos ao treinamento de resistência para indução do overtraining; FOR = overreaching funcional; NFOR/SOT =overreaching não-funcional. TMP= teste máximo de performance. Para análise da microbiota realizou-se sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA pelo Illumina.....59

Figura 2. Histograma de distribuição dos grupos; overreaching não funcional (NFOR/SOT, n = 14) e overreaching funcional (FOR, n = 19). A linha tracejada indica o α crítico de -0,98 kg m utilizado para classificação dos subgrupos FOR e NFOR.....63

Figura 3. Desempenho (D) e velocidade máxima (Vmax) atingida pelos ratos nos testes máximos de performance 2 (TMP-2) e 7 (TMP-7). *Indica aumento de D e Vmax para o grupo FOR, quando comparado com os grupos SSED e NFOR/SOT. # Indica que NFOR/SOT foi maior que SSED. £ Indica aumento de FOR e NFOR/SOT em relação a SSED. § Indica tendência de aumento ($P=0,058$) do desempenho de SSED (TMP-2 vs TMP-7). SSED=grupo semi-sedentário; FOR=overreaching funcional; NFOR/SOT=overreaching não-funcional/síndrome de overtraining.....69

Figura 4. Massa corpórea no TMP-7. *Indica que a massa corpórea foi menor para FOR e NFOR em relação a SSED; SSED= grupo semi-sedentário; FOR = overreaching funcional; NFOR/SOT = overreaching não-funcional/síndrome de overtraining.....70

Figura 5. Em (A) Abundância relativa de filos bacterianos. (B) Abundância relativa de gêneros bacterianos. As diferentes cores correspondem aos filos e gêneros bacterianos. Retângulos representam filos e gêneros específicos organizados em ordem de abundância.....73

Figura 6. Abundância relativa no nível filo. FOR (amarelo, n = 8), NFOR/SOT (laranja, n= 8), semi-sedentário -SSED (rosa escuro, n = 8). * Indica diferença pelo teste de teste de Wilcoxon (p <0,05).....74

Figura 7. Diversidade alfa no nível da OTU (Unidades Taxonômicas Operacionais). FOR (amarelo, n = 8), NFOR/SOT (laranja, n= 8), semi-sedentário (SSED, rosa escuro, n = 8). *Indica diferença entre os grupos pelo teste de teste de Wilcoxon, (p < 0,05).....75

Figura 8. Diversidade beta. Gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA) bidimensional (A) e tridimensional (B) a partir da análise de permutação multivariada (PERMANOVA) usando função 'adonis' implementado no pacote de análises do Vegan (v2.5.6).....76

CAPÍTULO - 4 COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS E EQUINOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO INTENSO

Figura 1. Principais filos que apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Em A, microbiota fecal de equinos. Em B, microbiota cecal de ratos.....100

Figura 2. Principais gêneros que apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Em A, microbiota fecal de equinos. Em B, microbiota cecal de ratos.....101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2- AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE OVERTRAINING

Tabela 1. Protocolo de overtraining (HOHL et al., 2009).....30

Tabela 2. Desempenhos dos grupos experimentais.....39

CAPÍTULO 3 – TREINAMENTO AERÓBIO PARA INDUÇÃO DE OVERREACHING/ OVERTRAINING MODIFICOU A MICROBIOTA CECAL DE RATOS WISTAR

Tabela 1. Protocolo de treino para indução do overtraining.....58

LISTA DE ABREVIATURAS

AR% - Abundância Relativa
CK – Creatina fosfoquinase
FOR – Overreaching Funcional
IFN- γ – Interferon-gama
IL – Interleucinas
IL-10 – Interleucina dez
IL-1 β – Interleucina beta-um
IL-6 – Interleucina seis
IMC – Índice de Massa Corporal
INN – Interferon
MM – Mangalarga Marchador
MT – Microbiota intestinal
NFOR – Overreaching não funcional
NGS – Next Generation Sequence
OTU – Operational Taxonomic UNITTT
RFA – Resposta de Fase Aguda
SED – Grupo sedentário
SOT – Síndrome Overtraining
SSED - Grupo semi-sedentário
TGI – Trato gastrintestinal
TJs – Tight Junctions
TMP – Teste Máximo de Performance
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa
TR – Grupo treinado

OVERREACHING/OVERTRAINING DE RATOS WISTAR: RESPOSTA INFLAMATÓRIA, MICROBIOTA INTESTINAL E COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA COM EQUINOS

RESUMO

É conhecido que o exercício pode induzir respostas inflamatórias com relativa repercussão sobre múltiplos órgãos e evidências científicas indicam que o mutualismo entre a microbiota intestinal (MI) e o hospedeiro pode ser modificado por programas de treinamento. Quando o equilíbrio delicado entre sessões de exercícios de alta carga e adequado períodos de recuperação é interrompido, o treinamento excessivo, conhecido como *overtraining*, pode levar ao declínio transitório (*overreaching* funcional - FOR) ou persistente (*overreaching* não funcional/síndrome *overtraining* - NFOR/SOT) do desempenho. Aqui foi caracterizada a dinâmica de citocinas intestinais, bem como a resposta da microbiota cecal, explorando mudanças na composição e estrutura microbiana de ratos Wistar machos sob condições FOR e NFOR submetidos a teste de esforço máximo na esteira. Para caracterização das condições FOR e NFOR dois grupos foram utilizados. O primeiro foi utilizado como referência, semi-sedentário (SSED), que realizou programa de condicionamento leve e, outro, treinado (TR), que executou programa de treino intenso, constituído por doze semanas e cinco fases. A fase final foi prescrita com períodos de recuperação reduzidos. FOR e NFOR/SOT foram determinadas por meio de avaliação longitudinal pelo método que considera o trabalho mecânico (W) efetuado durante teste de esforço máximo. Obteve-se DNA metagenômico para sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA pelo Illumina. NFOR/SOT apresentou redução de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10 no íleo e não houve alteração nas interleucinas colônicas, sendo evidenciado que a “hipótese de *Smith* das citocinas para condição de *overtraining*” parece não ocorrer no intestino já que íleo de citocinas tanto anti como pro-inflamatória. NFOR/SOT apresentou valores menores nos índices correspondentes à diversidade α , tais como “observed”, ACE, Chao1, Fisher e phylogenetic diversity (PD). Detectou-se redução do filo *Proteobacteria* na condição NFOR. A presença destacada do gênero *Lactobacillus*, em ambas as condições, pode significar resposta adaptativa protetora do intestino para atletas sob treinamento intensificado. As modificações obtidas aqui podem ter implicações na patogênese de algumas enfermidades, assim como na proteção intestinal.

Palavras-chave: Inflamação, Táxons bacterianos, Disbiose, Gene rRNA 16S, Microbioma, Desempenho

OVERREACHING/OVERTRAINING OF WISTAR RATS: INFLAMMATORY RESPONSE, INTESTINAL MICROBIOTA AND COMPARISON RELATIVE ABUNDANCE WITH HORSES

ABSTRACT

Regular excessive exercise is known to induce an increase in the production and release of proinflammatory cytokines with relative repercussions on multiple organ systems, and scientific evidence has indicated that training programs may impact the mutualism between the gut bacterial communities and the host. When the tenuous balance between high-external training load and adequate recovery periods becomes inadequate, we can characterize excessive training by a short-term (functional overreaching - FOR) or extreme (non-functional overreaching/overtraining syndrome - NFOR) performance reduction. Herein, we presented the concentration of ileal and colonic mucosa cytokines and characterized the cecal microbiota's response, exploring changes in the gut bacterial microbiota composition and structure of Wistar rats under FOR and NFOR conditions undergoing a maximum treadmill exercise test. We used a semi-sedentary (SSED) rats group as a reference, which we submitted to a light conditioning program, and another trained (TR) group, which was submitted to an endurance training-overtraining, consisting of twelve weeks and five phases. We prescribed the final phase with reduced recovery periods. FOR and NFOR/SOT were determined employing longitudinal evaluation using the method that considers the mechanical work (W) performed during the maximum exercise test. Metagenomic DNA was obtained to sequence the V4-V5 region of the 16S rRNA gene by Illumina. FOR displayed a significant performance enhancement while the NFOR showed a relevant performance decline. FOR/SOT showed a reduction in TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , and IL-10 in the ileum mucosa concentrations, and there was no change in colonic cytokines, evidencing that the Smith's cytokine theory for overtraining can not be applied to the gut because the proinflammatory cytokine is not elevated. FOR/SOT demonstrated the lowest alpha diversity indexes, such as "observed," ACE, Chao1, Fisher, and phylogenetic diversity. We detected a reduction in the *Proteobacteria* phylum in the NFOR condition. The prominent presence of the *Lactobacillus* genus, in both circumstances, can mean a gut adaptive protective response for athletes under intensified training. Our results found herein may have implications for some intestinal diseases' pathophysiology and numerous benefits for athletes. They may also provide insight into how gut microbes and hosts interact to promote health.

Keywords: Inflammation, Bacterial taxa, Dysbiosis, 16S rRNA Gene, Microbiome, Performance

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

A microbiota intestinal (MI) contém trilhões de microrganismos que formam milhares de espécies diferentes. Quantidade considerável de achados científicos sustenta funções primárias e diversificadas do microbioma gastrointestinal (GI) dos vertebrados que pode influenciar a saúde do hospedeiro. Estudos recentes com atletas da espécie humana (Zeppa et al., 2019), bem como em modelos experimentais com ratos, camundongos e equinos relataram que o exercício físico pode alterar a microbiota intestinal (MI). Esta interação complexa dos microrganismos, principalmente bactérias, pode auxiliar no controle da homeostase do hospedeiro.

O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração é considerado uma revolução para a descoberta de novos organismos e para um melhor entendimento das interações entre bactérias e, delas, com o meio em que vivem. Por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, determinou-se que a maior parte dos organismos que constituem a microbiota intestinal trata-se de bactérias não cultiváveis em meios de cultura tradicionais e que a maior parte delas estavam até então desconhecidas (Eckburg et al., 2005). Existem 10 vezes mais bactérias do que células humanas em nosso corpo, sendo que a maioria está presente no trato gastrointestinal que contém até 1000 diferentes espécies e aproximadamente 10^{12} bactérias/grama de fezes (Suau et al., 1999). Devido à sua complexidade e ao imenso material genético pertencente às suas bactérias, o sistema digestório tem sido classificado costumeiramente como o “segundo genoma”.

Diversos estudos revelaram que a MI exerce papel fundamental na regulação metabólica e imunológica e que diferentes populações bacterianas estão relacionadas à obesidade (Turnbaugh et al., 2009), síndrome do intestino irritável (Frank et al., 2007), diabetes tipo I (Wen et al., 2008) e até mesmo em certos aspectos comportamentais (Neufeld et al., 2011). Diversos fatores podem levar a mudanças na composição da

microbiota intestinal, como por exemplo, a dieta e a utilização de diversos medicamentos como antibióticos e suplementos (Preids et al., 2009). Numa visão holística, é nítido o interesse da comunidade científica e mercado especializado, para prospecção de bactérias e genes com potencial de aplicação biotecnológica que auxilie na confecção de prebióticos (Respondek et al., 2008), probióticos (Gu e Liu, 2013) e até de biocombustíveis (Li et al., 2012).

Neste contexto, existe interesse a respeito de estudos que tenham foco na tríade treinamento intenso-aptidão aeróbia-microbiota intestinal. Desta maneira, incrementos na intensidade e volume de treinamento produzem resposta estressante crônica, sendo costumeiramente prescritos por treinadores, na tentativa de melhorar a aptidão aeróbia dos atletas. Quando o equilíbrio entre a prescrição de sobrecarga do treinamento e o período suficiente para recuperação é interrompido, pode ocorrer, no curto prazo, condição conhecida como *overreaching* funcional (FOR) (Aubry et al., 2015). Esta condição pode ser incluída na periodização e planejamento de programas de treinamento, sendo considerada estratégia de condicionamento de atletas de alto rendimento atlético. Assim, a condição FOR pode promover redução intensa e reversível da aptidão física (Rietjens et al., 2005), notadamente, quando são subsequentemente prescritos períodos de recuperação, em dias ou semanas. Este efeito é conhecido como supercompensação (Meeusen et al., 2013), ou seja, passado o período de recuperação, prescrito corretamente, ocorre aumento da aptidão física do atleta, quando comparado aos níveis de condicionamento anteriores.

Quando ocorre a intensificação contínua da carga do treinamento associada à prescrição incorreta da recuperação, os atletas podem evoluir para um estado extremo de FOR ou *overreaching* não funcional (NFOR) (Myrick et al., 2015). Isto promove estagnação ou redução no desempenho, condição que pode perdurar semanas ou meses, mesmo associado a períodos de recuperação (Meeusen et al., 2013). Esta condição também é conhecida como síndrome do *overtraining* (SOT), estado que possui etiologia multifatorial, podendo provocar ou não, sinais clínicos, fisiológicos e comportamentais, promovendo redução da capacidade física de atletas de alto nível, que

estão no “limite fisiológico e psíquico” (Carfagno et al., 2014). Tendo em vista o conflito de conceito e nomenclatura existente na vasta literatura sobre a SOT, no presente estudo seguimos o posicionamento da *Joint Consensus Statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine* (Meeusen et al., 2013). Isto posto, nossa hipótese é que a indução das condições FOR/NFOR ou SOT pode provocar modificações na biodiversidade da MI de ratos Wistar. Interleucinas do íleo e do cólon também foram estudadas. Na presente *Tese* foram empregadas as abreviaturas “FOR” para *overreaching* funcional e “NFOR/SOT” para a condição *overreaching* não funcional, tendo em vista que nesta última abreviação pode ocorrer interdependência entre as condições NFOR e a síndrome *overtraining* propriamente dita.

2. Revisão de literatura

2.1 Síndrome do *overtraining* (SOT)

Em humanos, síndrome do *overtraining* é manifestada por meio de sinais clínicos e comportamentais como redução do desempenho, fadiga crônica, depressão, redução do apetite, irritabilidade e ansiedade, entre outros (Macgowan e Whitworth, 2008). Outros animais utilizados em modalidades esportivas, como atletas da espécie equina, também demonstraram mudanças comportamentais relacionadas a ausência de equilíbrio na relação treinamento:recuperação, associado ao aumento do número de competições, concomitante a períodos longos de transporte e mudanças ambientais (Graaf-Roelfsema et al., 2007).

Algumas alterações fisiológicas são descritas na SOT tais como mudanças nas concentrações plasmáticas de lactato após esforço máximo e elevação das concentrações do cortisol sérico (Urhausen et al., 2002). Contudo, nenhuma dessas alterações foi considerada confiável, quando avaliada isoladamente, para o diagnóstico da SOT (Petibois et al., 2002; Graaf-Roelfsema et al., 2007).

SOT pode ser estudada em modelos experimentais com roedores, pois estes permitem mais facilmente análises de amostras biológicas, bem como da MI que podem contribuir na elucidação de mecanismos envolvidos na manutenção da biodiversidade bacteriana fecal (Hold et al., 2014). A comunidade científica possui interesse na descrição de mecanismos etiopatogênicos envolvidos na SOT. Atualmente, métodos específicos e sensíveis para o diagnóstico da SOT são escassos. Neste sentido, a utilização de protocolos experimentais de indução da FOR/SOT em roedores, assim como o diagnóstico das possíveis modificações na diversidade e composição da MI relacionadas a esta síndrome, ainda são escassos.

Numa temporada de treinamento periodizado ocorre prescrição de intensidades progressivas com a finalidade de produzir alterações fisiológicas e comportamentais benéficas para aumentar o condicionamento físico dos atletas. Neste processo, os atletas podem ser submetidos a várias fases dentro de uma temporada competitiva com períodos de inaptações, especialmente nos períodos de intensificação do treino que são costumeiramente utilizados na tentativa de incrementar a aptidão aeróbia. Como resultado, atletas podem apresentar sinais clínicos e comportamentais de fadiga aguda, a partir de única sessão ou período de treino (fadigas sucessivas), intercalados por períodos curtos ou inadequados de recuperação. Esta estratégia é chamada *overreaching* funcional (FOR) podendo induzir supercompensação que promove aumento de performance (Meeusen et al. 2013).

Segundo Meeusen *et al.* (2006), *overtraining* é provocado pelo processo contínuo de treinamento intensificado com possíveis resultados de *overreaching*¹ funcional (FOR)², *overreaching* não-funcional (NFOR)³ ou síndrome de sobretreinamento (SOT). O FOR ocorre quando o treino é intensificado, resultando numa redução momentânea no desempenho que é revertida com prescrição de períodos de recuperação adequados. Isto provoca uma supercompensação que promove o condicionamento (Gandra et al.,

¹ Ir além de; exceder; ultrapassar.

² Treino intensificado com períodos adequados de recuperação e resultados positivos para o atleta.

³ Treino intensifica sem períodos adequados de recuperação e resultados não desejáveis para o atleta.

2012). Já o estado NFOR ocorre quando se intensifica, de maneira crônica, as intensidades de esforço sem a devida atenção ao ciclo treino-recuperação. Como consequência, ocorrerá uma redução do desempenho com o tempo de recuperação de várias semanas ou meses, podendo apresentar sintomas como fadiga e alterações endócrinas, bioquímicas, imunológicas e fisiológicas (Meeusen *et al.*, 2006). O estado NFOR pode evoluir para SOT, que possui recuperação ainda mais prolongada, ocorrendo “inadaptação prolongada” do atleta (Meeusen *et al.*, 2013). Na presente tese adotamos, de acordo com as definições para a SOT, as seguintes denominações para composição dos grupos experimentais: ratos que treinaram (TR) e, posteriormente, evoluíram para condições FOR ou NFOR.

2.2 Exercício, inflamação e Teoria de Smith

Embora a prática de exercício físico possa ser considerada intervenção preventiva ou terapêutica não farmacológica (Jonas e Phillips, 2012) é conhecido na literatura o paradoxo do atleta de elite (Gleeson *et al.*, 2011). A prática de exercício intenso pode promover não somente microlesões ou até mesmo lesão muscular esquelética (Cheng *et al.*, 2020), mas induzir uma série de efeitos pro-inflamatórios sobre tecidos e órgãos diversos, tais como fígado, coração e sistema nervoso central (Rocha *et al.*, 2019).

Do ponto de vista da mediação da resposta inflamatória, citocinas podem ser secretadas por quase todas as células nucleadas, sendo que atuam como mediadores autócrinos, endócrinos e parácrinos, estimulando ou inibindo sua síntese e controlando a produção de outras citocinas e seus receptores (Kamkin e Kiseleva, 2011; Rocha *et al.*, 2019). Em relação ao exercício físico, a dinâmica das citocinas entre o local de produção e sua distribuição, via corrente circulatória, é utilizada para explicar algumas condições fisiopatológicas em outros órgãos, sendo tradicionalmente conhecida a teoria de Smith. Conceitualmente, a hipótese da citocina de Smith (Smith, 2000; Smith, 2004) considera que treinamento com carga externa e interna alta, associado a recuperação insuficiente, pode induzir alguns microtraumas sobre a musculatura esquelética. O músculo produz e libera IL-1 beta (IL-1 β), IL-6 e TNF-alfa (TNF- α). Concentrações plasmáticas elevadas de

citocinas pró-inflamatórias podem interagir com diferentes órgãos, iniciando a maioria dos sinais e sintomas associados a redução marcante do desempenho induzida pelo excesso de treinamento. Exemplificando, respostas pro-inflamatórias sistêmicas provocadas por cargas excessivas de treino podem contribuir com hipertrofia cardíaca patogênica (Bernardo et al., 2010). Também esta resposta pode ser observada no sistema nervoso central. Altas concentrações hipotalâmicas induzidas por estímulos inflamatórios periféricos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α estão relacionados a redução da ingestão de alimentos e ganho de massa corpórea, situações fisiopatogênicas que induzem catabolismo (Rocha et al., 2019). Na presente tese nós verificamos se estas respostas supramencionadas ocorrem no trato gastrointestinal (TGI), especificamente no íleo e cólon de ratos Wistar, após exercício intenso em esteira e sob condições FOR ou NFOR. Ademais, complementamos esta visão caracterizando a composição da MI cecal destes animais.

2.3 Exercício e microbiota intestinal (MI)

O exercício físico é estímulo estressante mais fisiológico que existe, pois propicia alterações transitórias em diversas variáveis homeostáticas, sendo que estas mudanças podem ser quantificadas por meio de ferramentas laboratoriais. Dependendo do tipo de esforço, que é diferenciado tanto pela frequência e duração (volume) como pela intensidade (velocidade) de uma sessão de exercício, tais modificações são observadas em variáveis que indicam respostas, cardíacas e hematológicas (Ferraz et al., 2009), estado ácido-base (Ferraz et al., 2010a), endócrinas (Ferraz et al., 2010b), bem como o grau de desidratação (Lindinger e Ecker, 2013), entre outras. Exemplificando, num teste de esforço máximo na esteira é clássica a resposta sistêmica, porém reversível, de indução de acidose metabólica provocada pelo incremento da taxa glicolítica da fibra muscular esquelética (Robergs et al., 2004), que gera quantidade significativa de íons hidrogênio (H⁺). Quais serão as possíveis repercussões desta resposta sistêmica sobre a homeostase da microbiota intestinal de ratos e equinos?

No corpo humano existem 10 vezes mais bactérias do que células humanas, sendo que a maioria está presente no GI, que contém até 1000 diferentes espécies e aproximadamente 10¹² bactérias/grama de fezes (Suau et al., 1999). Devido à sua

complexidade e ao imenso material genético pertencente à suas bactérias, o sistema digestório tem sido classificado costumeiramente como o “segundo genoma” (Grice e Segre, 2012).

Os microrganismos estão presentes em todos os ambientes da biosfera. Entretanto, devido a dificuldade de se reproduzir em laboratório as mesmas condições naturais do meio que habitam, a maioria desses microrganismos não foi estudado. Métodos tradicionais de cultura permitem somente avaliação superficial dos componentes do microbioma, sendo limitação importante devido a provável presença de microrganismos incultiváveis (Eckburg et al., 2005). Dessa forma, o desenvolvimento das técnicas biomoleculares, como o sequenciamento de nova geração do gene 16S rRNA é considerado revolução para a descoberta de novos organismos e para melhor entendimento das interações entre as bactérias e destas com o meio que interagem. Por meio desta tecnologia, estabeleceu-se que a maior parte dos micróbios que constituem a MI era formada por bactérias até então desconhecidas (Slatiko et al., 2018).

Desta maneira, o interesse acadêmico em caracterizar a diversidade e a estrutura populacional de bactérias intestinais dos equinos e roedores, assim como investigar possíveis fatores responsáveis que modifiquem sua homeostase, vem ao encontro com a fisiologia digestiva destas espécies, no que diz respeito as suas nuances relacionadas com o processo de evolução e domesticação. Com o passar do tempo a espécie equina conseguiu se moldar e desempenhar seu papel como animais de esporte, lazer, criação e lida com o gado preservando a sua vida, apesar de todas as imperfeições caracterizadas frequentemente por transtornos digestivos como a síndrome do abdomen agudo (cólicas). Desta maneira, modificações na sua microbiota intestinal podem trazer prejuízos a sua saúde. O manejo intensificado de atletas da espécie equina pode modificar a microbiota fecal estando, por vezes, associado com alterações digestivas e metabólicas que podem reduzir o condicionamento físico ao exercício. Ademais, é nítido o interesse pela comunidade científica e pelo mercado especializado, pela prospecção de bactérias e genes com potencial de aplicação biotecnológica que auxilie na confecção de prebióticos (Respondek et al., 2008) e probióticos (Weese, 2002; Gu e Liu, 2013) e até produção de biocombustíveis (Li et al., 2012).

Com enfoque no exercício físico, alguns estudos contemporâneos, que empregaram técnicas de sequenciamento genético relataram o efeito do exercício sobre a MI em animais. Os achados destas pesquisas indicaram que o exercício agudo ou crônico modificou a estrutura e diversidade da MI de camundongos (Allen et al., 2015) e equinos (Almeida et al., 2016). Outros estudos identificaram que a variação de esforço produziu alterações na microbiota cecal ou fecal de camundongos normais e diabéticos ou de ratos obesos ou hipertensos (Petriz et al., 2014; Lambert et al., 2015).

Como a influência do exercício sobre a MI é relativamente pouco estudada, alguns pesquisadores propuseram que a plasticidade do tecido muscular, induzida pela prática de atividade física, pode interferir na MI por meio de metabólitos oriundos da musculatura que, em tese, atuariam de maneira sistêmica, inclusive sobre o compartimento intestinal. Um estudo sobre o impacto do exercício associado ao consumo de dieta variada identificou elevação da diversidade da MI, que revelou correlação positiva com a atividade da enzima creatina cinase (CK) em atletas de rugby de elite (Clarke et al., 2014).

A MI faz parte de complexa e densa interação de microrganismos, principalmente bactérias, que auxiliam na manutenção da homeostase do hospedeiro (Gubert et al., 2020). Na espécie humana e equina, o equilíbrio da MI pode ser modificado por algumas condições extrínsecas, tais como afecções gastrintestinais (Costa et al., 2012), mudanças na dieta (Clarke et al., 2014) e administrações de antibióticos (Harlow et al., 2013). Atualmente, o foco das pesquisas está relacionado aos possíveis impactos sobre a diversidade da MI provocados pelo exercício físico. Outro aspecto a ser considerado é que os resultados apresentados na literatura foram obtidos a partir de estudos com variações consideráveis no tipo de dieta (Hold et al., 2014). Nesse contexto, dados da literatura relataram que a prática de exercício físico é a maneira mais efetiva para provocar balanço energético negativo e melhorar as funções fisiológicas (Queipo-Ortuño et al., 2013). Contudo, são raras as informações na literatura, inclusive com atletas, que relacionaram a prática de exercício intenso e com programas de condicionamento físico que podem induzir *overtraining*, com possíveis alterações na estrutura e composição. Estas duas últimas características contribuem para determinação da diversidade da MI.

Nesta pesquisa nosso grupo de pesquisa almejou verificar se ocorrem alterações agudas, promovidas por teste de esforço na esteira, na composição e diversidade da microbiota cecal de ratos submetidos a programa de treino gerador das condições FOR NFOR/SOT. Estudo com jogadores de *Rugby* revelou correlação positiva entre alguns índices de riqueza, α diversidade (Catchall e inverso de Simpson) com a atividade sérica da enzima CK sugerindo que o exercício pode ser considerado fator que, sinalização muscular, modifica a diversidade no intestino (Clarke et al., 2014). Nosso grupo de pesquisa encontrou após suplementação crônica com cromo ou L-Carnitina, associada ao exercício intenso e programa de condicionamento físico moderado, modificações na composição da comunidade da MI de potras da raça Mangalarga Marchador em estágio incipiente de condicionamento físico. Este foi o primeiro estudo que utilizou modelo experimental de prescrição controlada da carga de esforço para avaliar alterações na população bacteriana de potras. A contribuição deste estudo foi mostrar o possível potencial tanto do exercício agudo como crônico, da mesma forma que suplementações ergogênicas, em modificar a microbiota intestinal (Almeida et al., 2016).

Diversos aspectos da vida moderna e do manejo dos animais que foram domesticados podem interferir na composição da MI, sendo que esta comunidade microbiana se tornou o foco de diversas disciplinas biológicas, notadamente, devido a sua possível contribuição para a manutenção da saúde ao longo da vida do organismo hospedeiro. Como citado anteriormente, as mudanças na composição da microbiota estão relacionadas com alterações comportamentais, obesidade e enfermidades crônicas. Alguns estudos recentes, publicados em periódicos de impacto científico relativamente significativo, que envolveu a espécie humana ou animais de laboratório forneceram evidências que a atividade física pode interferir na comunidade microbiana intestinal (Clarke et al., 2014; Evans et al., 2014; Allen et al., 2015).

Neste contexto é praticamente inexistente na literatura, informações que relacionaram tanto a prática aguda de exercício intenso como a realização crônica de esforço físico (condicionamento físico) com possíveis alterações no microbioma intestinal de equinos e cecal de ratos. O exercício induziu modificações na MI de ratos Wistar

normais, obesos e hipertensos que foram submetidos a um protocolo de condicionamento aeróbio 5 vezes por semana por 4 semanas (Petriz et al., 2014). Outro estudo encontrou que o exercício modificou a microbiota de camundongos diabéticos provocando abundância relativa maior da espécie *Firmicutes* e redução de *Bacteroides/Prevotella* spp. Neste mesmo estudo foi encontrada proporção maior de *Bifidobacterium* spp nos camundongos normais em relação aos diabéticos, sendo que os autores concluíram que estudos futuros são necessários para elucidar como a atividade física pode interferir na MI (Lambert et al., 2015).

Com relação ao esporte de alto rendimento os resultados de alguns estudos produziram evidências que alguns sinalizadores musculares como a enzima CK poderiam interferir na MI por meio sistêmico. Um estudo recente sobre o impacto do exercício associado à ingestão de dieta variada identificou aumento da diversidade da MI, que teve correlação positiva com a atividade da CK em atletas de alto rendimento de rugby (O'Sullivan et al., 2015; Clarke et al., 2014).

A presente pesquisa também pretendeu verificar se existem alterações adaptativas sobre a microbiota intestinal de equinos submetidos ao exercício intenso na esteira bem como em ratos submetidos a um programa de condicionamento físico para indução das condições FOR NFOR/SOT. Existem na literatura diversas definições para treinamento, sendo que especificamente o treinamento físico promove a melhora ou a manutenção do desempenho máximo e das habilidades específicas, bem como a procrastinação da fadiga minimizando a incidência de lesões, garantindo a manutenção e a disposição do entusiasmo para realização de exercício. O significado do termo condicionamento é mais restrito, representando a melhoria da condição atlética por meio de alterações adaptativas corpóreas que podem ser avaliadas por ferramentas básicas, porém norteadas pela metodologia científica, como a lactatemia (Lindner, 2010) e pH plasmático (Ferraz et al., 2010a). O objetivo central de qualquer programa de condicionamento de atletas é estimular adaptações metabólicas e fisiológicas que proporcionem aumento da aptidão atlética. Para tanto, sessões de exercício intercaladas com períodos de descanso devem ser prescritas com planejamento (Marlin e Nankervis, 2013; Ferraz et al. 2010b). A imposição de exercícios com intensidade progressiva em

períodos regulares promove alterações benéficas estruturais e funcionais no organismo atleta, proporcionando o incremento da capacidade competitiva (Evans, 2000).

No presente estudo nós utilizamos sequenciamento genético de nova geração para estudar possíveis modificações agudas na microbiota cecal de ratos submetidos a sessões de exercício (testes de esforço incrementais máximo) e por um protocolo experimental de treino para indução das condições FOR e NFOR/SOT. Os procedimentos experimentais realizados foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FCAV) de acordo com o protocolo nº 23593/15.

3. Objetivo

Neste trabalho, o objetivo central foi avaliar, de maneira aguda, citocinas intestinais e a composição da microbiota cecal de ratos sob condições FOR ou NFOR/SOT. O protocolo de indução para as condições FOR e NFOR foi adaptado a partir de estudo prévio (HOHL et al., 2009), método prescrito, nas suas fases finais, a partir da combinação persistente de sobrecarga excessiva com períodos de recuperação inadequados objetivando produzir declínio no desempenho.

4. Referências (ABNT - NRB-6023, outubro de 2015)

ABCCMM 2009. Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador. **Regulamento Geral para Eventos Oficializados do Cavalo Mangalarga Marchador**, Belo Horizonte, 54 p.

ADAMS, J. The fourth age of research. **Nature**, v. 497, p. 557–560, 2013.

ALMEIDA, M.L.M.; FERINGER, W.H.; CARVALHO, J.R.G.; RODRIGUES, I.M.; JORDAO, L.R.; FONSECA, M. G.; LEMOS, E.G.D.M.; WEESE, J.S.; COSTA, M.C.; FERRAZ, G.C. Intense exercise and aerobic conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0167108, 2016.

ALLEN J.M., MILLER M.E.B., PENCE B.D., WHITLOCK K., NEHRA V., GASKINS H.R., WOODS J.A. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol.* 2015;118: 1059-1066. doi: 10.1152/jappphysiol.01077.2014

ARGENZIO, R. A.; SOUTHWORTH, M.; STEVENS, C. E. Sites of organic acid production and absorption in the equine gastrointestinal tract. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 226, n. 5, p. 1043-1050, 1974.

AUBRY, A.; HAUSSWIRTH, C.; LOUIS, J.; COUTTS, A. J.; BUCHHEIT, M.; LE MEUR, Y. AUBRY. 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.

BACURAU, R. F.; NAVARRO, F.; BASSIT, R. A.; MENEGUELLO, M. O.; SANTOS, R. V.; ALMEIDA, A. L. Does exercise training interfere with the effects of l-carnitine supplementation? **Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 337-341, 2003.

BERNARDO, B.C.; WEEKS, K.L.; PRETORIUS, L.; MCMULLEN, J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 191-227, 2010.

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.

CHENG, A.J.; JUDE, B.; LANNER, J.T. Intramuscular mechanisms of overtraining. **Redox Biology**, p. 101480, 2020.

CLARKE, S.F.; MURPHY, E. F.; O'SULLIVAN, LUCEY, AJ, HUMPHREYS M, HOGAN A, COTTER P D. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. **Gut**, v. 63, p. 1913-1920, 2014.

COSTA, M. C.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; STÄMPFLI, H. R.; KIM, P. T.; STURGEON, A.; WEESE J. S. Comparison of the Fecal Microbiota of Healthy Horses and Horses with Colitis by High Throughput Sequencing of the V3-V5 Region of the 16S rRNA Gene. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, e41484, 2012.

COSTA, M. C.; STÄMPFLI, H. R.; ARROYO, L. G.; GOMES, R. G.; WEESE J. S. Effects of parenteral antimicrobials on the equine fecal microbiome investigated by next generation sequencing. **Proceedings of the 2013 ACVIM Forum**, Seattle, 2013.

COSTA, M. C.; WEESE, J. S. The equine intestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 01, p. 121-128, 2012.

DAVIE, A. J. A scientific approach to training thoroughbreds. In: LINDNER A (Ed.) Management of lameness causes in sport horses pp. 69–83. Wageningen thenetherlands: The Wageningen Press, 2006.

DE LA COCHETIÈRE, M. F.; DURAND, T.; LALANDE, V.; PETIT, J. C.; POTEL, G.; BEAUGERIE, L. Effect of antibiotic therapy on human fecal microbiota and the relation to the development of *Clostridium difficile*. **Microbial ecology**, v. 56, n. 3, p. 395-402, 2008.

DONATI ZEPPA S., AGOSTINI D., GERVASI M., ANNIBALINI G., AMATORI S., FERRINI F., STOCCHI V. Mutual Interactions among Exercise, Sport Supplements and Microbiota. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 17, 2020.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

EVANS, C.C.; LEPARD, K.J.; KWAK, J.W.; STANCUKAS, M.C.; LASKOWSKI, S.; DOUGHERTY, J.; ANTONOPOULOS, D.A. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92193, 2014.

EVANS, D.L. Training and fitness in athletic horse. Sidney: **RIRDC.**, 64p. 2000.

FERRAZ, G.C.; SOARES, O.A.B.; FOZ, N.S.B.; PEREIRA, M.C.; QUEIROZ-NETO, A. The workload and plasma ion concentration in a training match session of high-goal (elite) polo ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 191-195, 2010a.

FERRAZ, G.C.; TEIXEIRA NETO, A. R.; PEREIRA, M.C.; LINARDI, R.L.; LACERDA NETO, J. C.; QUEIROZ-NETO, A. Influence of the aerobic training on cortisol and glucose levels in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 23-29, 2010b.

FERRAZ, G.C.; TEIXEIRA-NETO, A.R.; D'ANGELIS, F.H.F.; LACERDA-NETO, J.C.; QUEIROZ-NETO, A. Alterações hematológicas e cardíacas em cavalos Árabes submetidos ao teste de esforço crescente em esteira rolante. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 431-437, 2009.

FRANK, D.N.; AMAND, A.L.S.; FELDMAN, R.A.; BOEDEKER, E.C.; HARPAZ, N.; PACE, N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 34, p. 13780-13785, 2007.

GANDRA, P.G.; VALENTE, R.H.; PERALES, J.; PACHECO, A.G.F.; MACEDO, D.V. Proteomic profiling of skeletal muscle in an animal model of overtraining. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2663-2667, 2012.

GEOR, R.J. The role of nutritional supplements and feeding strategies in equine athletic performance. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 3, n. 03, p. 109-119, 2006.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STENSEL, D.J.; LINDLEY, M.R.; MASTANA, S.S.; NIMMO, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 9, p. 607-615, 2011.

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.

GRICE, E.A.; SEGRE, J.A. The human microbiome: our second genome. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 13, p. 151-170, 2012.

GRONVOLD, A.; L'ABÉE-LUND, T. M.; STRAND, E.; SORUM, H.; YANNARELL, A. C.; & MACKIE, R. I. Fecal microbiota of horses in the clinical setting: potential effects of penicillin and general anesthesia. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 366-372, 2010.

GU, W.; LIU, J. C. Probiotics in Critically Ill Patients: More Data Are Needed. **CHEST Journal**, v. 143, n. 3, p. 873-874, 2013.

GUBERT, C., KONG, G., RENOIR, T., HANNAN, A. J. Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 134, p. 104621, 2020.

HARLOW, B.E.; LAWRENCE, L.M.; FLYTHE, M.D. Diarrhea-associated pathogens, lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces: Responses to antibiotic challenge. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 1-2, p. 225-232, 2013.

HARRIS, P. A.; HARRIS, R. C. Ergogenic potential of nutritional strategies and substances in the horse. **Livestock Production Science**, v. 92, n. 2, p. 147-165, 2005.

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. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 5, p. 1155-63, 2009.

HOLD, G.L. The gut microbiota, dietary extremes and exercise. **Gut**, v. 63, n. 12, p. 1838-1839, 2014.

JONAS, S.; PHILLIPS, E.M. **ACSM's exercise is medicine™: A clinician's guide to exercise prescription**. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

KAMKIN, A.; KISELEVA, I. (Ed.). **Mechanical stretch and cytokines**. Springer Science & Business Media, 2011.

LAMBERT, J.E.; MYSLICKI, J.P.; BOMHOF, M.R.; BELKE, D.D.; SHEARER, J.; REIMER, R.A. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 999, p. 1-4, 2015.

LI, Y.; HU, L.; XUE, G.; LIU, H.; YANG, H.; ZHU, Y.; TIAN Y.; LU X. Comparison of bacterial diversity in large intestine of Xiangxi yellow cattle (*Bos taurus*) associated with different diet: Fresh *Miscanthus sinensis* and mixed forage. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 30, p. 5965-5974, 2012.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. **Piracicaba: ESALQ/USP**, 2006.

LINDINGER, M. I.; ECKER, G. L. Gastric emptying, intestinal absorption of electrolytes and exercise performance in electrolyte-supplemented horses. **Experimental physiology**, v. 98, n. 1, p. 193-206, 2013.

LINDNER, A. E. Maximal lactate steady state during exercise in blood of horses. **Journal of animal science**, v. 88, n. 6, p. 2038-2044, 2010.

LORENZO-FIGUERAS, M.; MERRITT, A. M.; HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J.; KANEPS, A. J. Effects of exercise on gastrointestinal function. **Equine Exercise Physiology-The Science of Exercise in the Athletic Horse**. Saunders Elsevier, The Netherlands, p. 424-440, 2008.

MARLIN, D.; NANKERVIS, K.J. **Equine exercise physiology**. John Wiley & Sons, 2013.

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

MARLIN, D.; NANKERVIS, K. J. **Equine exercise physiology**. John Wiley & Sons, 2013.

MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; FOSTER, C.; FRY, A.; GLEESON, M.; NIEMAN, D.; 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.

MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; GLEESON, M.; RIETJENS, G.; STEINACKER, J.; URHAUSEN, A. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome: ECSS

position statement 'task force'. **European Journal of Sport Science**, v. 6, n. 01, p. 1-14, 2006.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of horses**. 6.ed. Washington: The National Academies Press, 2007. 341 p.

NEUFELD, K. A. M.; KANG, N.; BIENENSTOCK, J.; FOSTER, J. A. Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. **Communicative & integrative biology**, v. 4, n. 4, p. 492-494, 2011.

O'SULLIVAN, O.; CRONIN, O.; CLARKE, S. F.; MURPHY, E. F.; MOLLOY, M. G.; SHANAHAN, F.; COTTER, P. D. Exercise and the microbiota. **Gut microbes**, v. 6, p. 131-136, 2015.

PAGAN, J. D.; BURGER, I.; JACKSON, S. G. The influence of time of feeding on exercise response in Thoroughbreds fed a fat supplemented or high carbohydrate diet. In: **PROCEEDINGS OF THE EQUINE NUTRITION AND PHYSIOLOGY SYMPOSIUM**, 9, 1995, East Lansing. p. 92-93.

PAGAN, J. D.; JACKSON, S. G.; DUREN, S. E. The effect of chromium supplementation on metabolic response to exercise in Thoroughbred horses. **Kentucky Equine Research**, Inc., 2000. Disponível em: <www.ker.com/library/advances/130.pdf>. Acessado em: 8 ago. 2010.

PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; POORTMANS, J. R.; DÉLÉRIS, G. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports. **Sports Medicine**, v. 32, n. 13, p. 867-878, 2002.

PETRIZ B.A.; CASTRO A.P.; ALMEIDA J.A.; GOMES C.P.; FERNANDES G.R.; KRUGER R.H.; PEREIRA R.W.; FRANCO O.L. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 511, 2014.

PRATES, R. C.; REZENDE, H. H. C. D.; LANA, Â. M.Q.; BORGES, I.; MOSS, P.C.B.; MOURA, R.S.D.; REZENDE, A.S.C.D. Heart rate of Mangalarga Marchador mares under marcha test and supplemented with chrome. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 916-922, 2009.

PREIDIS, G.A.; VERSALOVIC, J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 2015-2031, 2009

QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; SEOANE, L.M.; MURRI, M.; PARDO, M.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; CARDONA, F.; TINAHONES, F.J. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e65465, 2013.

RESPONDEK, F.; SWANSON, K. S.; BELSITO, K. R.; VESTER, B. M.; WAGNER, A.; ISTASSE, L.; DIEZ, M. Short-chain fructooligosaccharides influence insulin sensitivity and gene expression of fat tissue in obese dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 9, p. 1712-1718, 2008.

REZENDE JORDÃO, L.D.; BERGMANN, J.A.G.; MOURA, R.S.; MELO, M.M.; COSTA, M.L.; MOSS, P.C.; REZENDE, A.S.C.D. Effect of feed at different times prior to exercise and chelated chromium supplementation on the athletic performance of Mangalarga Marchador mares. **Comparative Exercise Physiology**, v. 7, n. 03, p. 133-140, 2010.

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. 1, 2005.

RIVERO, J.LL. A scientific background for skeletal muscle conditioning in equine practice. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 54, n. 6, p. 321-332, 2007.

ROBERGS, R.A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 3, p. R502-R516, 2004.

RUBIN, M. A.; MILLER, J. P.; RYAN, A. S.; TREUTH, M. S.; PATTERSON, K. Y.; PRATLEY, R. E.; ANDERSON, R. A. Acute and chronic resistive exercise increase urinary chromium excretion in men as measured with an enriched chromium stable isotope. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 1, p. 73-78, 1998.

SANTIAGO, J.M.; CARNEIRO, A. S.; REZENDE, M.G.F.; ABRANTES, R.G.P.; LAGE, J.; LANA, Â.M.Q. Comparação entre as medidas morfométricas do rebanho atual de machos mangalarga marchador e dos campeões da raça. **Boletim de Indústria Animal**, v. 70, n. 1, p. 46-52, 2013.

SIMOM, C.; DANIEL, R. Metagenomics analyses: past and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology Journal**, v. 77, p. 1153-1161, 2011.

SLATKO, B.E.; GARDNER, A.F.; AUSUBEL, F.M. Overview of next-generation sequencing technologies. **Current protocols in molecular biology**, v. 122, n. 1, p. e59, 2018.

SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 2, p. 317, 2000.

SMITH, L.L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 18, n. 1, p. 185-193, 2004.

SUAU, A.; BONNET, R.; SUTREN, M.; GODON, J.J.; GIBSON, G.R.; COLLINS, M. D., DORÉ, J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4799–4807, 1999.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. P.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009.

URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Diagnosis of overtraining. **Sports medicine**, v. 32, n. 2, p. 95-102, 2002.

VIEIRA, E.R.; VIEIRA, E.R.; DE REZENDE, A.S.C.; LANA, A.M.Q.; BARCELOS, K.M.C.; SANTIAGO, J.M.; LAGE, J.; FONSECA, M.G.; BERGMANN, J.A.G. Characterization of equidae breeding in Minas Gerais state. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 319-323, 2015.

WEESE, J.S. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, n. 8, p. 357-360, 2002.

WEN, L.; LEY, R. E.; VOLCHKOV, P. Y.; STRANGES, P. B.; AVANESYAN, L.; STONEBRAKER, A. C.; HU, C.; WONG, F. S.; SZOT, G. L.; BLUESTONE, J. A.; GORDON, J. I.; CHERVONSKY, A. V. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1109-1113, 2008.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS DE RATOS WISTAR SOB CONDIÇÃO DE OVERTRAINING

1. Resumo

A síndrome do *overtraining* (SOT) promove redução ou estagnação do desempenho atlético, sendo causada por desequilíbrio entre sessões de treino e a duração da recuperação. Esta síndrome pode estar associada com alterações nas citocinas, especialmente produzidas pela musculatura esquelética. Pouco se sabe sobre a produção de citocinas no trato gastrointestinal em indivíduos com SOT. Objetivou-se quantificar, nas mucosas ileal e colônica, citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-6, IL-1 β e IFN- γ e anti-inflamatória, IL-10, de ratos Wistar submetidos a modelo experimental de indução das condições *overreaching* funcional (FOR) ou não funcional (NFOR). Utilizaram-se quatro grupos, controle negativo (SED, não realizou nenhuma atividade física) ou positivo (SSED) e treinados (TR). Dezesesseis ratos compuseram o grupo SSED e realizaram programa de condicionamento leve (1 sessão / dia / 2x / sem./12 m.min⁻¹). Os outros ratos (TR, $n=33$), foram submetidos ao programa de treino para indução das condições FOR e NFOR, com duração de 12 sem., prescrito para produzir desequilíbrio entre sessões de exercício e período de recuperação. Em 8 sem. foram realizadas sessões de treino diárias, por 5 d consecutivos seguidas por 2 d de recuperação. Nas 4 sem. subsequentes, houve aumento da frequência de treino (2, 3, 4 e 4 x/d) e redução do tempo de recuperação entre as sessões (4, 3, 2 e 2 h). Para avaliação da aptidão aeróbia, os ratos foram submetidos a testes de esforço máximo, sendo que o primeiro teste foi realizado antes (TMP-1) e na 4° (TMP-2), 8° (TMP-3), 9° (TMP-4), 10° (TMP-5), 11° (TMP-6) e 12° semana (TMP-7). Dois grupos foram identificados pela diferença da inclinação (α) obtida a partir da regressão linear dos desempenhos individuais nos TMP-4, 5, 6 e 7. Ratos NFOR tiveram $\alpha = < -0.98$. Logo após a realização do TMP-7 foram coletados o íleo e cólon, para análise do epitélio intestinal e quantificação de citocinas por meio de ELISA. FOR e NFOR tiveram aumento de desempenho a partir do TMP-2 (303.8 ± 13.8 ; 294.3 ± 18.9 e 190.2 ± 12.2 kg.m, respectivamente). O grupo NFOR teve o desempenho reduzido no TMP-7 (292.2 ± 36.4 kg.m). Com relação ao íleo, houve redução de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10 para o grupo NFOR quando comparado ao grupo sedentário. IL-10 foi menor para o grupo FOR quando comparado ao grupo SED. Não houve alteração nas interleucinas colônicas. Os achados evidenciaram redução de citocinas tanto anti como pró-inflamatória no íleo de ratos sob condições FOR e NFOR.

Palavras chaves: Exercício, interleucinas, alto rendimento, teoria de Smith.

2. Introdução

No meio esportivo, aumentos na intensidade e no volume do treinamento são comumente utilizados com intuito de melhorar a aptidão física de atletas de alto rendimento (Aubry et al., 2015). O excesso de treinamento pode ser considerado saudável quando se obtém adaptação caracterizada pela elevação do desempenho. O princípio da supercompensação, que inclui treinamento seguido de repouso, é bem conhecido por treinadores e atletas (Kenttä e Hassmén, 1998), condição conhecida como *overreaching* funcional (FOR). A FOR é caracterizada pela redução momentânea da aptidão física, podendo ocorrer incremento da capacidade aeróbia com períodos adequados de recuperação (Meeusen et al., 2013).

Porém, pode ocorrer excesso de treinamento que pode provocar respostas musculares negativas no atleta (Cheng et al., 2020), tendo como consequência má adaptação e queda ou estagnação do desempenho (Kenttä e Hassmén, 1998). Este mecanismo pode ser resultado do desequilíbrio relacionado ao ciclo treino:recuperação, criando uma condição chamada de *overreaching* não funcional (NFOR) (Aubry et al. 2015). A causa de lesões nos esportes é multifatorial e envolve fatores de risco extrínsecos e intrínsecos, mas é evidenciado que o gerenciamento de carga é um importante fator de risco (Soligard et al., 2016).

O processo crônico de NFOR, pode desencadear a síndrome do *overtraining* (SOT), sendo que a diferença entre as condições NFOR e SOT é tênue, sendo relacionada ao tempo de recuperação, que é mais prolongado na síndrome (Meeusen et al., 2006). A SOT pode apresentar sinais clínicos fisiológicos e comportamentais (Carfagno e Hendrix, 2014), bem como alterações metabólicas, endócrinas, bioquímicas e imunológicas (Meeusen et al., 2006). Pode também afetar diversos órgãos causando uma redução no desempenho do exercício por diferentes mecanismos, que inclui perda muscular, comprometimento da coordenação motora, menor força muscular (isotônica e isométrica), diminuição da absorção máxima de oxigênio e da resistência e alterações na atividade enzimática muscular (Schwellnus et al., 2016). Em humanos, foi relatado queda de desempenho físico, fadiga crônica, depressão, hiporexia, irritabilidade e ansiedade

(Macgowan e Whitworth, 2008). Os sintomas devem ser considerados isoladamente e juntos para que a síndrome seja melhor compreendida (Kenttä e Hassmén, 1998).

Alterações nas concentrações plasmáticas de lactato após esforço máximo, elevação das concentrações do cortisol sérico, alterações no metabolismo, em respostas hormonais e imunológicas também são descritas na SOT. Entretanto, nenhuma das alterações citadas anteriormente foram consideradas confiáveis, quando avaliados isoladamente, para o diagnóstico da SOT (Petibois et al., 2002; Urhausen e Kindermann, 2002; Graaf-Roelfsema et al., 2007).

Sabe-se que tanto na SOT como no NFOR, condições ainda pouco compreendidas, o equilíbrio homeostático envolvendo fatores hormonais, metabólicos e imunológicos é alterado (Ogonovszky et al., 2005). Diferentes tipos de exercício podem ter diversos efeitos sobre as variáveis imunológicas, com base na intensidade e tempo de duração das sessões (Gholamnezhad et al., 2014). Os órgãos afetados pela síndrome em atletas mostram um padrão, indicando que cerca de 50% dos atletas durante competições e torneios tem o trato respiratório afetado. Outros sistemas comumente afetados são o sistema digestório, genitourinário, pele e os tecidos subcutâneos. (Schwellnus et al., 2016).

Do ponto de vista imune, a primeira resposta do organismo ao estímulo imunológico é inata, não específica, precedendo uma reação imune específica. Nesta situação, citocinas pró-inflamatórias, principalmente a interleucina (IL)-6, são liberadas sendo que o sistema vascular e células inflamatórias são ativados. A esse processo, pode existir contribuição significativa dos eixos simpático-adrenal e hipotálamo-pituitária-adrenal (Murata, 2007) que ativam a produção de citocinas adicionais que, quando liberadas, ativam receptores em diferentes células-alvo produzindo reação sistêmica que resulta na ativação de diversas alterações orgânicas, sendo que a mais relacionada ao exercício é o catabolismo muscular (Gruys et al. 2005).

O estímulo estressante crônico pode ocasionar *overtraining*, podendo provocar reações neuro-imune-endócrinas pelo eixo encéfalo-intestino (Mulak e Bonaz, 2004), resultando em liberação de hormônios, citocinas inflamatórias e moléculas microbianas (Clark e Mach, 2016) causando diversos efeitos tais como, a desidratação, a diminuição

do fluxo sanguíneo intestinal (Luger et al., 1988), o estresse mecânico (Peters et al., 1995), a mudança do peristaltismo intestinal (Butcher, 1993; Berg et al., 1999). Hoje em dia é evidente o interesse da comunidade científica em estabelecer analogia entre as alterações imunológicas produzidas pelo exercício agudo (Giori et al., 2011; Gondin et al., 2013) com a resposta de fase aguda (RFA), que ocorre de forma rápida, refinada e inespecífica. Esta resposta pode ser semelhante a inúmeras doenças que causam vários graus de danos aos tecidos, como infecção, inflamação, trauma ou distúrbios imunológicos (Nazifi et al. 2010).

Neste contexto, a SOT pode ser estudada tendo como modelos experimentais roedores, pois permitem análises de amostras biológicas para esclarecer a patogenia envolvida nesta síndrome (Pereira et al., 2012). O intestino possui mecanismos de defesa contra agentes adversos como antígenos, macromoléculas mal digeridas e microrganismos, função executada pelo epitélio intestinal (Turner, 2009) e pela resposta inflamatória através das citocinas (Mainous et al., 1995). A integridade do epitélio intestinal se deve aos desmossomos, aos *tight junctions* (TJs) e às junções aderentes (Turner, 2009). A função primordial do epitélio intestinal é a formação de uma barreira protetora, que impeça substâncias nocivas do lúmen intestinal de alcançarem a circulação sistêmica, promovendo a proteção do organismo (Turner, 2009).

Diversas enfermidades são associadas ao aumento da permeabilidade intestinal, por mecanismos que modificam as TJs, permitindo a invasão de antígenos aos tecidos e ativação da resposta inflamatória local e sistêmica (Deitch, 1990). O estresse do calor e do dano oxidativo no exercício pode causar abertura das Tight Junctions tendo aumento da permeabilidade intestinal à endotoxinas, que se movem para a corrente sanguínea, levando a uma resposta imune sistêmica. A integridade das *tight junctions* e junções aderentes é alterada pela fosforilação das proteínas ocludina e claudinas, que pode ser alterada pelo tipo de exercício. O exercício prolongado e o exercício de alta intensidade levam a um aumento nas enzimas de fosforilação que causam disfunções das junções (Zuhl et al., 2012).

A resposta inflamatória no intestino pode ser desencadeada por antígenos existentes na circulação sanguínea e antígenos liberados por bactérias na mucosa

(Konigsrainer et al., 2011). Recentes evidências em roedores mostram que há uma alta relação entre “stress” físico e emocional durante o exercício e mudanças na composição da microbiota gastrointestinal (Clark e Mach, 2016). Pode existir equilíbrio dinâmico entre as citocinas pró e anti-inflamatórias (Gholamnezhad et al., 2014) e nessas condições, o sistema imune e os enterócitos sintetizam muitos mediadores inflamatórios, dentre elas interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN), rompendo esse equilíbrio (Villa et al., 1995; Ogle et al., 1997). Tais mediadores são essenciais para desenvolvimento da resposta imune inata. As citocinas estão envolvidas no aumento exagerado da resposta inflamatória sistêmica e podem afetar a integridade da barreira epitelial intestinal (Mainous et al., 1995) e parecem comprometer as TJs ao modificar a expressão de suas proteínas e sua estrutura (Boivin et al., 2009). As citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) intensificam o desarranjo das TJs e aumenta a apoptose do epitélio intestinal (Bruewer et al., 2003). A IL-10, citocina anti-inflamatória, regula a resposta inflamatória, protegendo também contra a disfunção das TJs na inflamação (Van Der Poll et al., 1995). Estudos mostram que o exercício intenso durante períodos prolongados pode aumentar a permeabilidade intestinal e causar uma imunossupressão e que glicocorticoides liberados demonstram diminuir a capacidade de produzir citocinas anti-inflamatórias (Clark e Mach, 2016). Na presente pesquisa, foram avaliadas as concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-6, IL-1 β e IFN- γ e anti-inflamatória IL-10 e os efeitos dessas citocinas sobre o epitélio intestinal em ratos sedentários, FOR e NFOR. Obejetivou-se investigar efeitos da indução das condições de *overreaching* funcional ou não funcional sobre as citocinas intestinais pró e anti-inflamatórias.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Inicialmente utilizaram-se 100 ratos da linhagem *Wistar*, machos, jovens, pesando entre 150 e 250g, procedentes do Biotério Central da UNESP – Botucatu e mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UNESP - Jaboticabal. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas com cama de maravalha em um ambiente com ciclo de claro:escuro invertido (18h-6h luzes ligadas) e temperatura controlada (22°C), com água e ração para roedores (Agromix Nutrição Animal - Jaboticabal/SP- Brasil) *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais utilizando animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal.

2.2. Protocolo de treino para indução das condições FOR e NFOR

No presente planejamento de treino foi adicionado período de adaptação mais elevado, três semanas e, inserido uma semana adicional com finalidade de intensificar o treino, garantindo a manifestação das condições FOR ou NFOR/SOT. Os ratos foram adaptados à esteira (**Fig 1**) 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 e seguido a este procedimento deu-se início ao protocolo de treinamento para indução de *overtraining*. O planejamento de treino 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 sem 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 um desequilíbrio no ciclo treino: recuperação (**Tabela 1**).



Figura 1. Esteira motorizada para roedores. Fase de adaptação.

Tabela 1. Protocolo de *overtraining* (HOHL et al., 2009).

Etapas	Semana	Horário	Velocidade (m min ⁻¹)	Time (min)	Frequência diária	Recuperação (h)
Habituação	1 ^a	13:00-14:00	0	10	1x	24
	2 ^a	13:00-14:00	0	10	1x	24
	3 ^a	13:00-14:00	0	10	1x	24
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 (P1)	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
	5 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
Fase 2 (P2)	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 (P3)	9 ^a	6:00-18:00	25	60	2x	4
Fase 4 (P4)	10 ^a	6:00-18:00	25	60	3x	3
Fase 5 (P5)	11 ^a	6:00-18:00	25	60	4x	2
	12 ^a	6:00-18:00	25	60	4x	2

2.3. Teste máximo de performance (TMP)

Para a avaliação da aptidão física dos ratos durante o protocolo foram realizados sete testes de desempenho máximos (TMP) nos grupos SSED e TR, os quais ocorreram sempre 60 h após a última sessão de treino semanal. Os TMPs se iniciaram numa velocidade de 12 m/min que foi incrementada em 1 m/min a cada 2 min, até que o rato atingisse a velocidade de 20 m/min. Após este momento, a cada 3 min foi dado incremento de 2 m/min na velocidade até que o animal apresentasse sinal de exaustão. Todos os ratos foram pesados antes de cada TMP, para posterior quantificação do desempenho individual. O primeiro teste (TMP-1) foi realizado após a adaptação na esteira, sendo que os ratos que obtiverem desempenho adequado foram selecionados para iniciar o protocolo de *overtraining* (HOHL *et al.*, 2009). O TMP-2 foi realizado após a F1, o TMP-3 após a F2, o TMP-4 após a F3, o TMP-5 após a F4 e, o TMP-6 após a primeira semana da F5 e o TMP-7 após a segunda semana da F5 (**Tabela 1**).

2.4. Quantificação do desempenho

Para avaliar o desempenho dos ratos foi utilizado um modelo massa-dependente (HOHL *et al.* 2009). Para tanto é utilizado a seguinte equação:

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

Onde, D representa o desempenho do rato; Pr_i é o desempenho do rato em cada fase, m é a massa corpórea; V_i é a velocidade da fase; T_i é o tempo de corrida da fase; D_i é a distância da fase; e D é a distância total percorrida pelo rato durante o teste. Pr é expressa em quilogramas-metros (kg.m).

2.5. Delineamento Experimental

Para melhor entendimento do delineamento experimental foi elaborado o fluxograma do experimento que pode ser visualizado na **Fig 2**. Cabe mencionar que ocorreu exclusão de vinte e seis ratos, sendo que dezesseis destes foram aleatoriamente selecionados para formarem o grupo controle negativo sedentário (SED, n=16), que não realizou nenhum exercício físico forçado na esteira. Após o TMP-1, 49 ratos foram selecionados (ratos corredores com D entre 70 e 230 kg.m) e distribuídos em dois grupos: semi-sedentário (SSED, n=16) e treinado (TR, n=33). O grupo SSED foi utilizado para a distinção, por meio de modelo matemático, dos grupos FOR e NFOR (item 3.6). Desta maneira, este grupo realizou condicionamento leve (uma sessão de treino, duas vezes por semana a 12 m/min por 10 minutos). O grupo TR realizou o protocolo descrito na **Tabela 1**. Finalmente, após o TMP-7, os ratos do grupo TR foram distribuídos em *overreaching* funcional (FOR) e não funcional (NFOR), de acordo com a avaliação do TMP-7 em relação aos TMP-2, 3, 4, 5 e 6.

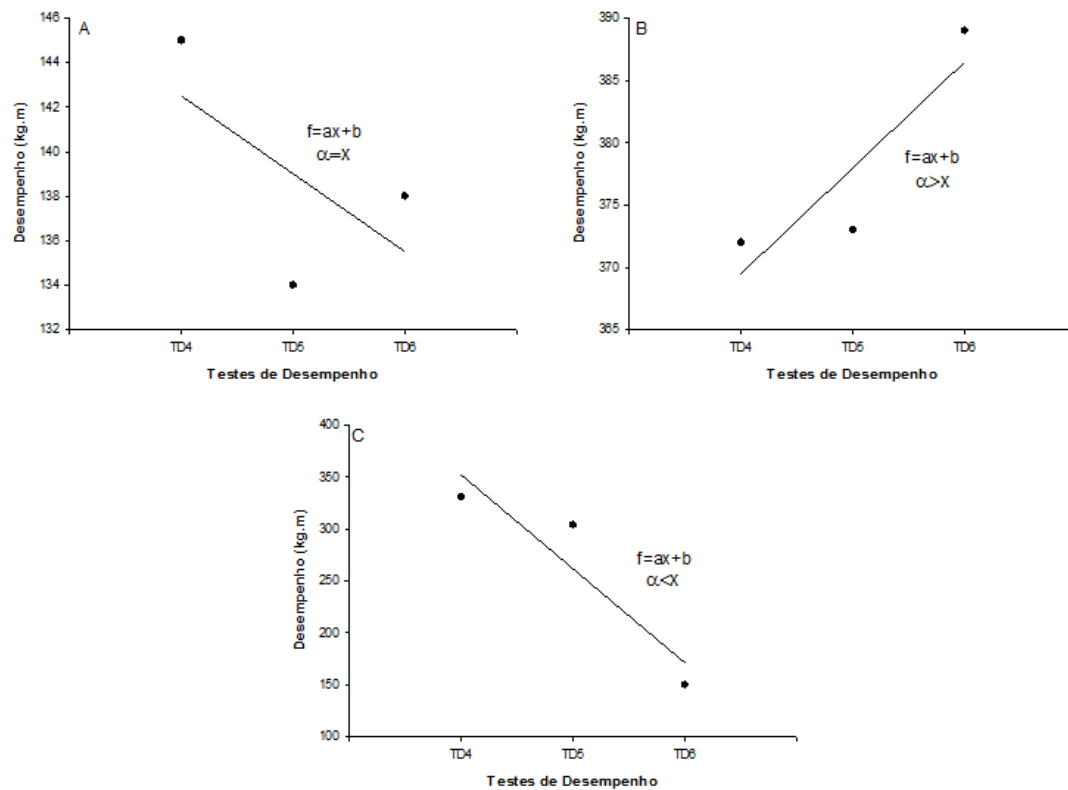


Figura 3. Exemplo do estabelecimento dos grupos FOR e NFOR. **A:** representação do SSED; **B:** representação do FOR; **C:** representação do NFOR.

2.6. Estabelecimento das condições *overreaching* funcional (FOR) e não funcional (NFOR)

O declínio do desempenho foi verificado objetivando separar os ratos em FOR e NFOR. Para tanto, quantificou-se a inclinação (α) de uma função linear obtida a partir de regressão dos quadrados mínimos ($y=ax + b$) dos desempenhos (D) nos testes TMP-2, 3, 4, 5 e 6. O valor da inclinação crítica para a separação dos grupos foi baseado nos resultados obtidos para o grupo SSED (**Fig 3**). Este valor crítico para separar os grupos FOR e NFOR foi o valor da média α do grupo SSED menos 1 DP (desvio-padrão) (adaptado de HOHL et al., 2009), sendo que o α crítico foi - 0,98 kg.m ($14,38 \pm 15,36$ kg.m para o grupo SSED). A **Fig 4** revela o histograma da distribuição dos grupos FOR e NFOR. Posteriormente, 8 ratos de cada grupo experimental (SED, SSED, FOR e NFOR) foram anestesiados e submetidos à eutanásia 30 min após o TMP-7, após a obtenção de amostras sanguíneas. O restante dos ratos foi utilizado para realização de outros estudos do nosso grupo de pesquisa.

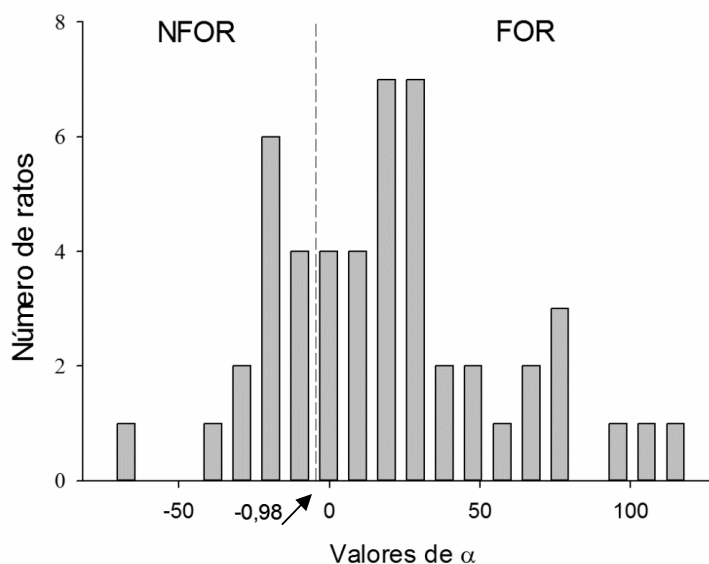


Figura 4. Histograma de distribuição dos grupos; *Overreaching* não funcional (NFOR, n=14) e *Overreaching* funcional (FOR, n=19). Seta: Indica o α crítico de -0,98 kg.m utilizado para classificação dos grupos experimentais.

2.7. Coleta do íleo e cólon

Após o TMP-7, os ratos foram submetidos a eutanásia por meio de uma associação anestésica contendo cetamina (Centamin® 10%, Syntec, Barueri, SP, Brasil) cloridrato de xilazina (Xilazin® 2%, Syntec, Barueri, SP, Brasil) e acepromazina (Apromazin® 1%, Syntec, Barueri, SP, Brasil) nas doses de 5,56, 0,55 e 0,11 mg/kg, respectivamente para a coleta de sangue e dos tecidos. Para tanto, o abdômen foi aberto por laparotomia mediana. O íleo foi definido como o segmento de 10-15 cm proximal à válvula íleo-cecal, enquanto o cólon, o segmento entre os 3-5 cm posteriores à válvula (Markov et al., 2010). Esses segmentos intestinais foram isolados, seccionados, coletados, lavados em tampão fosfato salino (PBS; pH 7,2) gelado para a remoção do muco e do conteúdo fecal, e abertos longitudinalmente em placa de petri sob gelo. A mucosa de cada órgão foi removida pela raspagem da superfície com auxílio de lâmina de microscopia (Han et al., 2004). As amostras foram imediatamente congeladas em gelo

seco e armazenadas a -70°C . Neste momento foram coletados o íleo e o cólon dos ratos de todos os grupos (SED, SSSED, FOR e NFOR) para posterior análises histológicas e quantificação de citocinas.

2.8. Quantificação de citocinas

A técnica utilizada para as dosagens de citocinas no homogenato da mucosa do íleo e do cólon foi de ensaio imunoenzimático (ELISA). As placas de 96 poços (Maxisorp, NUNC) foram sensibilizadas com 50 μL /poço de anticorpo de captura específico para cada citocina [anti-IFN- γ (2 $\mu\text{g/mL}$), anti-TNF- α (4 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL-10 (4 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL-1 β (0,8 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL-6 (4 $\mu\text{g/mL}$)], (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), diluídos em PBS e incubadas a 4°C por 18-22 h. As foram lavadas com PBS/ Tween-20 (0,05%) e as ligações inespecíficas foram bloqueadas com 100 μL /poço de PBS contendo 1% de soro albumina bovina (Sigma) por 2 h à temperatura ambiente. As amostras e a curva padrão da proteína recombinante de cada citocina (50 μL) foram adicionadas à placa e incubadas por 16-24 h a 4°C . Após este período, as placas foram lavadas novamente, 50 μL do anticorpo biotilado (nas concentrações de IFN- γ = 150 ng/mL, TNF- α = 225 ng/mL, IL-10 = 300 ng/mL, IL-1 β = 350 ng/mL, IL-6 = 400 ng/mL,) foram adicionados e incubados por 1-2 h à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo não-ligado foi removido por nova lavagem e, posteriormente, o conjugado avidina-peroxidase (1:5000) acrescido a cada poço por 30 min. As placas foram lavadas e, a seguir, 50 μL do substrato TMB (tetrametilbenzidina; BD) misturado em partes iguais com solução de peróxido de hidrogênio, adicionado a cada poço. A reação foi interrompida pela adição de 50 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N e a absorbância determinada em comprimento de onda de 450 nm (ELISA Plate Scanner; Molecular Devices Corporation). Os resultados foram expressos em pg (de cada citocina)/mL.

2.9. Análise Histológica

Amostras do íleo e do cólon foram fixados em paraformaldeído 4%. Em seguida foram submetidos a série de sessões de desidratação crescentes e posteriormente emblocados em parafina. Após este procedimento as amostras foram seccionadas. Os cortes histológicos foram corados por hematoxilina-eosina. A histologia da mucosa intestinal foi avaliada conforme *scores* determinados em estudos anteriores (Lobo et al., 2003; Costantini et al., 2010).

2.10. Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada no programa Sigma Plot 12.0. Para comparação dos desempenhos (P) dos animais intragrupo utilizamos ANOVA para medidas repetidas no tempo. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). A comparação de apenas uma variável de três ou mais grupos foi analisada pelo teste de análise de variância de via única (*one-way* ANOVA) e as diferenças obtidas pelo pós-teste de Tukey.

3. Resultados

A partir das três semanas adaptativas, nós obtivemos percentual de ratos corredores de 75%. Para a confirmação das condições FOR e NFOR em ratos, utilizamos o desempenho (D), obtido a partir de TMPs, sendo que a **Tabela 2** revela a comparação intra e entre grupos SSED, FOR e NFOR. Houve aumento de desempenho para o grupo SSED a partir do TMP-5 ($P < 0.001$). 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 ($P = 0.001$). De maneira geral, após a seleção dos oitos ratos de cada grupo, para o presente estudo, houve a mesma tendência. Nós aplicamos a função quadrática $y = ax^2 + bx + c$ (onde y = desempenho, kg m e x = TMPs) para verificar o padrão matemático da curva de desempenho vs TMPs (**Fig 5**).

Tabela 2. Desempenhos dos grupos experimentais.

Desempenho kg.m (D)			
TMP	SSED (n=16)	FOR (n=19)	NFOR (n=14)
1	135.5 ± 9.6 ^a	129.5 ± 5.6 ^a	131.5 ± 9.5 ^a
2	190.2 ± 12.2 ^b	303.8 ± 13.8 ^{*a}	294.3 ± 18.9 ^{*a}
3	185.9 ± 11.9 ^b	391.3 ± 27.3 ^{*a}	455.9 ± 32.7 ^{*a}
4	193.6 ± 13.9 ^c	456.6 ± 30.1 ^{*a}	397.2 ± 35.7 ^{*b}
5	218.6 ± 24.3 ^{*c}	554.8 ± 42.1 ^{*a}	348.3 ± 50.6 ^{*b}
6	248.1 ± 17.8 ^{*c}	568.7 ± 37.1 ^{*a}	449.0 ± 41.0 ^{*b}
7	230.5 ± 16.9 ^{*b}	559.7 ± 53.0 ^{*a}	292.2 ± 36.4 ^{*∞b}

SSED = grupo controle; FOR = grupo *overreaching funcional*; NFOR = grupo *Nonfuncional overreaching não funcional*.

* Indica aumento de desempenho ao longo do período experimental ($P < 0.05$).

∞ Indica redução de desempenho em relação ao TMP-6 ($P < 0.05$).

Letras diferentes nas linhas indicam diferença entre os grupos ($P < 0.05$)

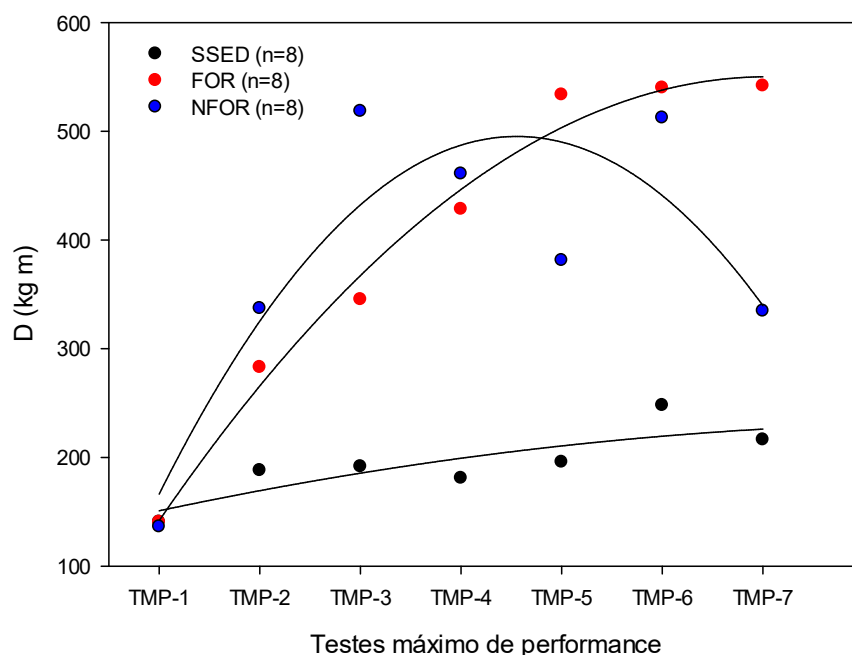


Figura 5. Desempenhos dos ratos durante o período experimental. Observar as linhas de tendências quadráticas SSED: $Y = -1,194x^2 + 22,08x + 130,04$ ($r^2=0,70$); FOR: $-26,04x^2 + 237,22x - 44,985$ ($r^2=0,75$); NFOR: $Y = -11,17x^2 + 157,42x - 4,4506$ ($r^2=0,98$). SSED = grupo controle; FOR = grupo *Overreaching funcional*; NFOR = grupo *não funcional overreaching*.

Os resultados das citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β e IFN- γ e anti-inflamatória IL-10, tanto do íleo como do cólon estão apresentados nas **Figs 6 e 7**, respectivamente. Com relação ao íleo, houve redução de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IFN- γ e IL-10 para o grupo NFOR, quando comparado ao grupo sedentário. IL-10 foi menor para o grupo FOR quando comparado ao grupo sedentário. Não houve alteração nas citocinas colônicas.

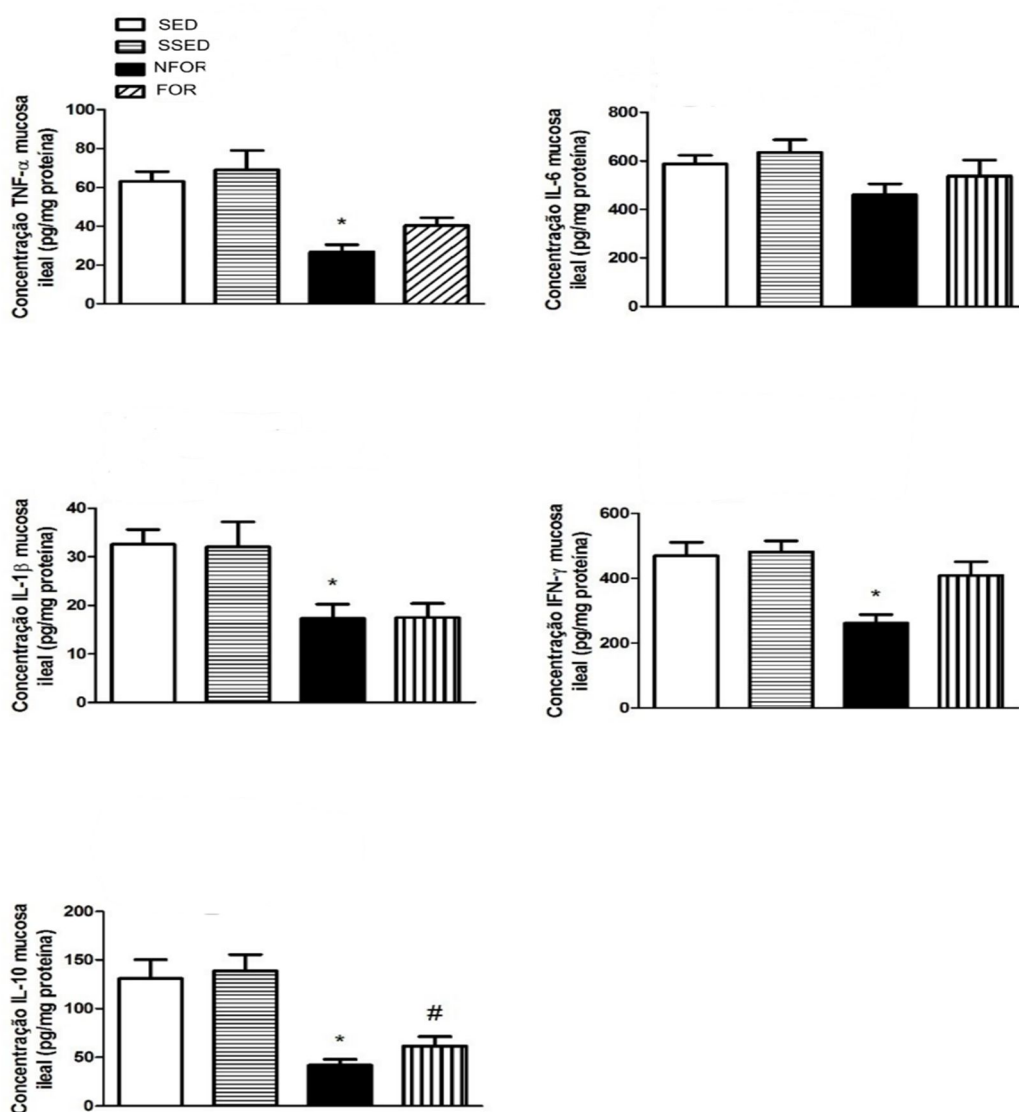


Figura 6. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IFN- γ e IL-10 ileal de ratos submetidos à indução das condições FOR e NFOR * Indica redução do grupo NFOR em relação ao grupo sedentário. # Indica redução do grupo FOR em relação ao grupo sedentário, pelo teste Tukey ($P < 0.05$).

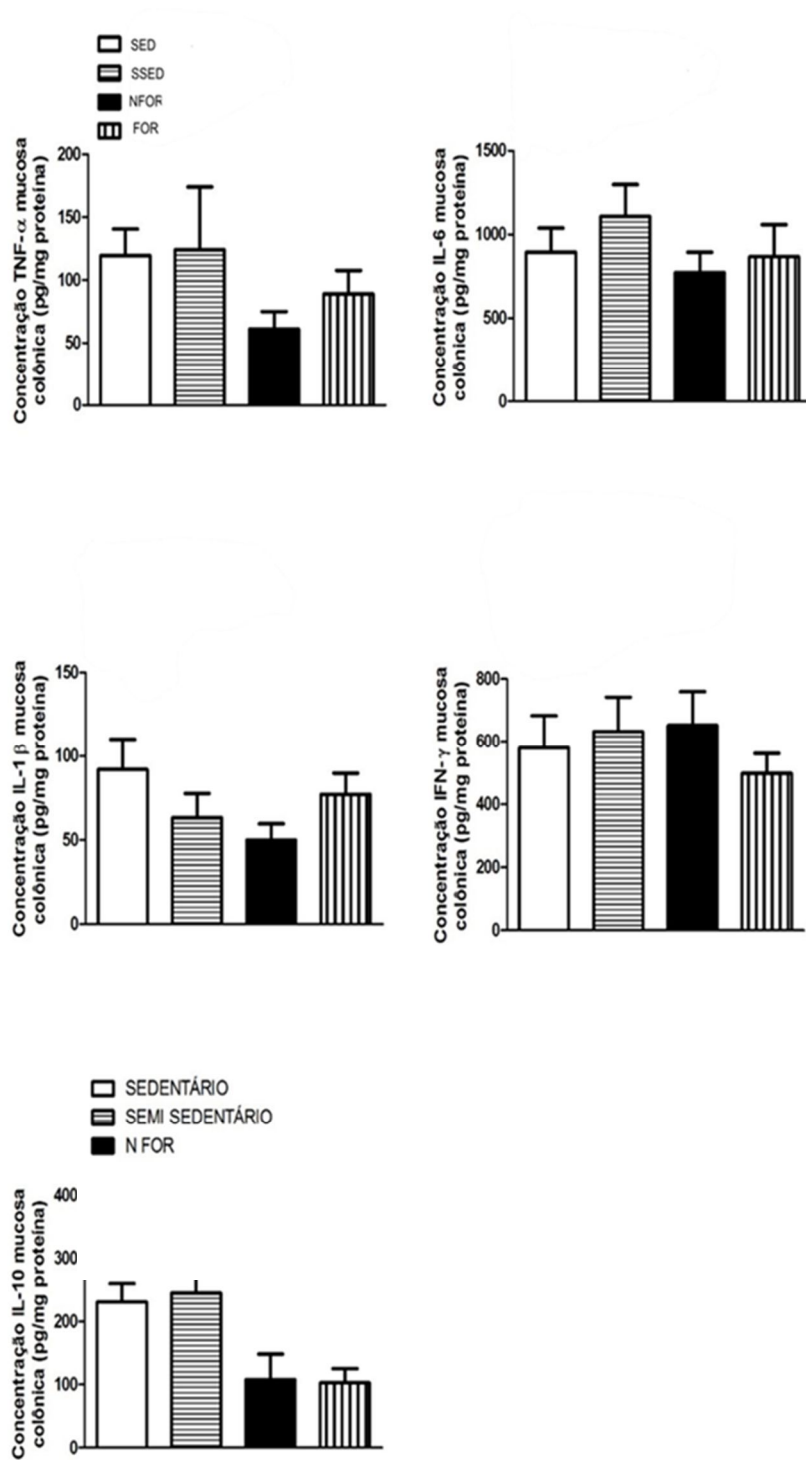


Figura 7. TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10 colônica de ratos submetidos à indução das condições FOR e NFOR.

A partir da análise das aberturas das *Tight Junctions* e Junções Aderentes do íleo e cólon através de Microscopia Eletrônica de Transmissão, foi constatado que não houve diferenças significativas entre os grupos (**Fig 8**).

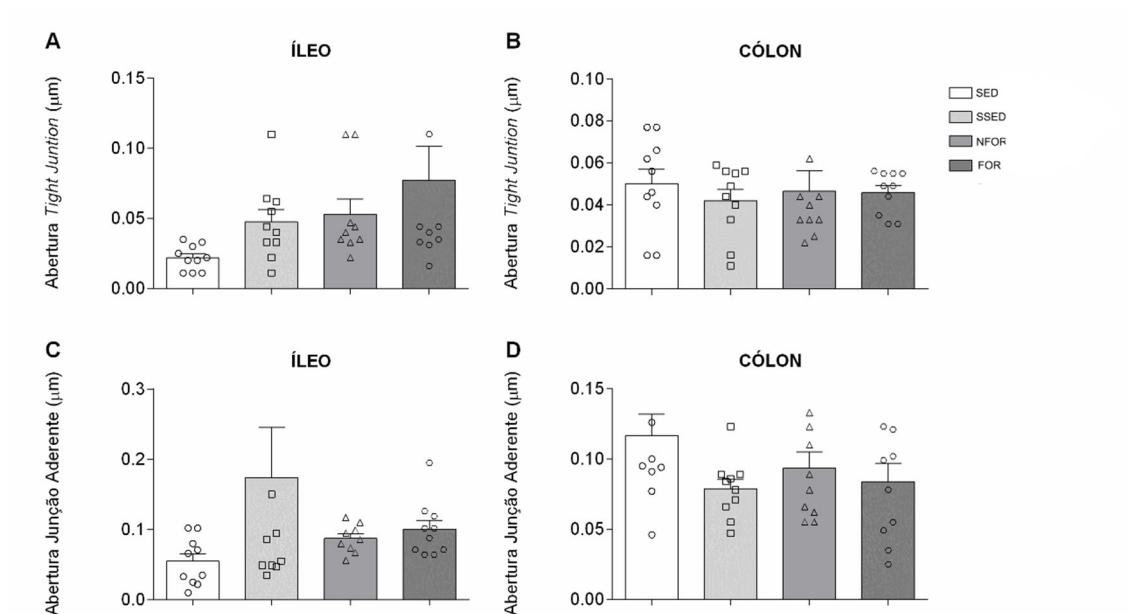


Figura 8 Distância na região das *Tight Junctions* e na região das Junções Aderentes no Íleo e Cólon de ratos submetidos à indução das condições FOR e NFOR.

4. Discussão

Os principais achados da presente pesquisa foram relacionados ao íleo, redução de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10 para o grupo NFOR e diminuição da IL-10 para o grupo FOR. A síndrome de *overtraining* se desenvolve em consequência de cargas excessivas de treinamento somada a prescrições inapropriadas do período de recuperação, promovendo estagnação/redução no desempenho e fadiga. O *overreaching* não funcional (NFOR) é estado semelhante relacionado à SOT, que se difere em relação ao tempo de permanência dos sinais e sintomas bem como na recuperação (Cadegiani e Kater, 2017). Os ratos Wistar foram submetidos a um protocolo, com avaliação do desempenho longitudinal de ratos, para indução de *overtraining* determinado previamente (Hohl et al., 2009). Foi avaliado citocinas da mucosa ilea e colônica nas condições FOR e NFOR.

Vale ressaltar que a fisiopatologia das condições FOR e NFOR ainda não foi totalmente compreendida, tanto pela sociedade científica quanto pelas equipes multidisciplinares que acompanham os atletas de alto rendimento, o que torna o diagnóstico preciso extremamente complexo (Cadegiani e Kater, 2017). A única variável bem estabelecida na literatura que está relacionada com as condições NFOR/SOT é a redução da aptidão física (Meeusen et al., 2013), considerada como “padrão ouro” para realização de diagnóstico.

Com relação aos testes de desempenho máximos realizados durante o treino aqui aplicado, 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 da aptidão aeróbia. A redução persistente da performance observada na condição NFOR

foi notória, sendo que os valores de desempenho não retornaram aos anteriormente atingidos nos TMP-3, 4, 5 e 6. Este achado corroborou os resultados encontrados em estudos previamente realizados em ratos e camundongos (Hohl et al., 2009; Pereira et al. 2012), que revelaram redução persistente do desempenho no grupo NFOR.

Estudos prévios propuseram a “hipótese das citocinas para condição de *overtraining*” (Teoria de *Smith*), sendo que os autores que elaboraram tal hipótese afirmaram que volume e intensidade elevados de treinamento com períodos de recuperação insuficientes podem produzir traumas musculares e articulares (Smith, 2004; Smith, 2000; Rocha et al., 2019). Assim, monócitos são ativados por quantidade significativa de citocinas pro-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α , induzindo condição inflamatória sistêmica ou local (Rocha et al., 2018). Interessante, a presente investigação evidenciou redução no íleo de citocinas tanto anti como pro-inflamatória nos grupos FOR e NFOR.

5. Conclusão

Como conclusão, no caso específico da mucosa do íleo e cólon dos ratos utilizados aqui, os achados não suportaram a teoria proposta por “Smith”.

6. Referências

AUBRY, A.; HAUSSWIRTH, C.; LOUIS, J.; COUTTS, A. J.; BUCHHEIT, M.; LE MEUR, Y. AUBRY. 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.

BERG, A.; MÜLLER, H. M.; RATHMANN, S.; DEIBERT, P. The gastrointestinal system--an essential target organ of the athlete's health and physical performance. **Exercise Immunology Review**, v. 5, p. 78-95, 1998.

BRUEWER, M.; LUEGERING, A.; KUCHARZIK, T.; PARKOS, C. A.; MADARA, J. L.; HOPKINS, A. M.; NUSRAT, A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 11, p. 6164-6172, 2003.

BOIVIN, M. A.; ROY, P. K.; BRADLEY, A.; KENNEDY, J. C.; RIHANI, T.; MA, T. Y. Mechanism of Interferon- γ -Induced Increase in T84 Intestinal Epithelial Tight Junction. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 1, p. 45-54, 2009

BUTCHER, J. D. Runner's diarrhea and other intestinal problems of athletes. **American Family Physician**, v. 48, n. 4, p. 623-627, 1993.

CADEGIANI, F.A.; KATER, C.E. Hormonal aspects of overtraining syndrome: a systematic review. **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, v. 9, n. 1, p. 14, 2017.

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.

CHENG, A.J.; JUDE, B.; LANNER, J.T. Intramuscular mechanisms of overtraining. **Redox Biology**, p. 101480, 2020.

COSTANTINI, T. W.; BANSAL, V.; KRZYZANIAK, M.; PUTNAM, J. G.; PETERSON, C. Y.; LOOMIS, W. H.; COIMBRA, R. Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 6, p. G1308-G1318, 2010.

DEITCH, E.A. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. **Archives of Surgery**, v. 125, n. 3, p. 403-404, 1990.

GHOLAMNEZHAD, Z.; BOSKABADY, M. H.; HOSSEIN, M.; SANKIAN, M.; KHAJAVI RAD, A. Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2014.

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.

GIORI, L.; MORETTI, P.; GIORDANO, A.; PALTRINIERI, S. Short-term evaluation of serum amyloid A after exercise in clinically healthy horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 9, p. 499-501, 2011.

GONDIN, M.R.; FOZ, N.S.; PEREIRA, M.C.; FLAGLIARI, J.J.; OROZCO, C.A.; D'ANGELIS, F.H.; QUEIROZ-NETO, A.; FERRAZ, G. C. Acute phase responses of different positions of high-goal (elite) polo ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 11, p. 956-961, 2013.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 6, n. 11, p. 1045, 2005.

HAN, X.; FINK, M. P.; YANG, R.; DELUDE, R. L. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. **Shock**, v. 21, n. 3, p. 261-270, 2004.

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.

KENTTÄ, G.; HASSMÉN, P. Overtraining and recovery. **Sports Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-16, 1998.

KÖNIGSRAINER, I.; TÜRCK, M. H.; EISNER, F.; MEILE, T.; HOFFMANN, J.; KÜPER, M.; GLATZLE, J. The gut is not only the target but a source of inflammatory mediators inhibiting gastrointestinal motility during sepsis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 753-760, 2011.

LOBO, S. M.; DE BACKER, D.; SUN, Q.; TU, Z.; DIMOPOULOS, G.; PREISER, J. C.; VINCENT, J. L. Gut mucosal damage during endotoxic shock is due to mechanisms other than gut ischemia. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 5, p. 2047-2054, 2003.

LUGER, A.; DEUSTER, P. A.; DEBOLT, J. E.; LORIAUX, D. L.; CHROUSOS, G. P. Acute exercise stimulates the renin-angiotensin-aldosterone axis: adaptive changes in runners. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 30, n. 1, p. 5-9, 1988.

MAINOUS, M. R.; ERTEL, W.; CHAUDRY, I. H.; DEITCH, E. A. The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? **Shock**, v. 4, n. 3, p. 193-199, 1995.

MARKOV, A. G.; VESHNYAKOVA, A.; FROMM, M.; AMASHEH, M.; AMASHEH, S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 180, n. 4, p. 591-598, 2010.

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

MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; GLEESON, M.; RIETJENS, G.; STEINACKER, J.; URHAUSEN, A. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome: ECSS position statement 'task force'. **European Journal of Sport Science**, v. 6, n. 01, p. 1-14, 2006.

MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; FOSTER, C.; FRY, A.; GLEESON, M.; NIEMAN, D.; 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.

NAZIFI, S.; RAZAVI, S.M.; REISZADEH, M.; ESMAILNEZHAD, Z.; ANSARI-LARI, M.; HASANSHAHI, F. Evaluation of the resistance of indigenous Iranian cattle to *Theileria annulata* compared with Holstein cattle by measurement of acute phase proteins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 2, p. 155-161, 2010.

OGLE, C. K.; GUO, X.; HASSELGREN, P. O.; OGLE, J. D.; ALEXANDER, J. W. The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin. **The European journal of surgery= Acta chirurgica**, v. 163, n. 1, p. 45-51, 1997.

OGONOVSKY, H.; SASVÁRI, M.; DOSEK, A.; BERKES, I.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; RADÁK, Z. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. **Canadian journal of applied physiology**, v. 30, n. 2, p. 186-195, 2005.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiological Reviews**, 2000.

PEREIRA, B.C.; LUIS FILHO, A.L.; ALVES, G. F.; PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; SOUZA, C. T.; SILVA, A. S. A new overtraining protocol for mice based on downhill running sessions. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 9, p. 793-798, 2012.

PETERS, H.P.; AKKERMANS, L.M.; BOL, E.; MOSTERD, W.L. GASTROINTESTINAL SYMPTOMS DURING EXERCISE. **Sports Medicine**, v. 20, N. 2, P. 65-76, 1995.

PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; POORTMANS, J.R.; DÉLÉRIS, G. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports. **Sports Medicine**, v. 32, n. 13, p. 867-878, 2002.

ROCHA, A.L.; PINTO, A. P.; PEREIRA, B.C.; KOHAMA, E.B.; MORAIS, G.P.; DE VICENTE, L.G.; HUGO FILHO, T. Positive effects of total recovery period on anti-and pro-inflammatory cytokines are not linked to performance re-establishment in overtrained mice. **Cytokine**, v. 103, p. 69-76, 2018.

ROCHA, A.L.; PINTO, A.P.; KOHAMA, E.B.; PAULI, J.R.; DE MOURA, L.P.; CINTRA, D. E.; DA SILVA, A. S. The proinflammatory effects of chronic excessive exercise. **Cytokine**, v. 119, p. 57-61, 2019.

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., p. 1043-1052, 2016

SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 2, p. 317, 2000.

SMITH, L.L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 18, n. 1, p. 185-193, 2004.

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.

TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799-809, 2009.

URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Diagnosis of overtraining. **Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 95-102, 2002.

VAN DER POLL, T.; MARCHANT, A.; BUURMAN, W.A.; BERMAN, L.; KEOGH, C.V.; LAZARUS, D.D.; LOWRY, S.F. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 11, p. 5397-5401, 1995.

VILLA, P.; SARTOR, G.; ANGELINI, M.; SIRONI, M.; CONNI, M.; GNOCCHI, P.; VAN TITS, L.J. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 5, p. 549-553, 1995.

ZUHL, M.; SCHNEIDER, S.; LANPHERE, K.; CONN, C.; DOKLADNY, K.; MOSELEY, P. Exercise regulation of intestinal tight junction proteins. **British Journal of Sports Medicine**, v. 48, n. 12, p. 980-986, 2014.

CAPÍTULO 3 –MICROBIOTA CECAL DIFERENCIOU RATOS WISTAR APÓS TESTE DE EXERCÍCIO MÁXIMO E SUBMETIDOS A TREINAMENTO PARA INDUÇÃO DE *OVERREACHING/OVERTRAINING*

1. Introdução

O TGI dos mamíferos é colonizado por trilhões de bactérias numa relação coletiva complexa, comumente referida como microbiota intestinal (MI), sendo que diversos fatores relacionados ao hospedeiro ou associados ao meio externo podem afetar a composição desta comunidade. Trata-se de ecossistema dinâmico que possui relação simbiótica, também classificada como eubiose, com a homeostase do hospedeiro. Ao contrário, desequilíbrios na composição da comunidade bacteriana intestinal, condição geralmente referida como disbiose, estão associados com respostas desfavoráveis do hospedeiro como estados patológicos relevantes. Exemplificando, disbiose da MI em indivíduos da espécie humana está associada ao amplo conjunto de enfermidades, incluindo diarreia¹, diabetes², câncer colorretal³, doença inflamatória intestinal⁴ e obesidade⁵.

Estudos recentes com animais ou atletas relataram que o exercício agudo ou crônico pode modificar esse comensalismo, modificando a composição e a função da MI, sendo que alguns resultados mostraram evidências científicas sobre existência de interação recíproca entre a musculatura esquelética e a comunidade microbiana⁶. Além disso, revisão da literatura recente mencionou que a população bacteriana intestinal pode ser modulada pelo estímulo estressante induzido pelo exercício, mediado pelo eixo MI-

intestino-encéfalo. O tronco encefálico pode receber sinalizações a partir de alterações homeostáticas da MI induzidas pelo exercício ou treinamento que podem modular o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, bem como o tônus simpático e parassimpático do sistema nervoso autônomo⁷.

A literatura recente sobre o tema mostra que essa relação tem se tornado foco de interesse convergente entre diversas áreas multidisciplinares da medicina esportiva. Na espécie equina, uma única sessão de exercício máximo, realizado próximo da intensidade de esforço relacionada à frequência cardíaca máxima, em esteira, assim como o condicionamento aeróbio com 42 dias de duração, cuja intensidade foi prescrita com base no limiar de lactato, foram suficientes para modificar a comunidade microbiana intestinal de potras em estágio incipiente de treinamento⁸.

Ademais, estudo com jogadores profissionais de rugby, altamente condicionados, detectou que o nível de condicionamento físico é fator importante na regulação da MI, sendo que atletas de elite desta modalidade apresentaram diversidade da MI mais elevada, quando comparado a indivíduos saudáveis com nível de atividade física entre moderada, ou até mesmo relativamente sedentários⁹.

Ainda sobre este tema, importante ressaltar que a α e β diversidades são importantes para manutenção da estabilidade da MI, bem como utilizadas como biomarcador de saúde do hospedeiro⁹. Em ratos, hígidos, obesos ou hipertensos, o treinamento em esteira, numa intensidade correspondente a máxima fase estável de lactato, 5 vezes por semana, durante 4 semanas, induziu alterações na composição e na diversidade da MI. A atividade física elevou a abundância relativa no nível gênero, especialmente de *Lactobacillus*¹⁰. Recentemente, estudo prospectivo demonstrou que

atletas da espécie humana hígidos que praticaram corrida de remo transatlântica, caracterizando exercício de ultra-resistência, demonstraram elevação da α diversidade da MI¹¹.

Outros microrganismos foram proeminentes na MI de animais de laboratório submetidos a sessões de exercício. Exemplificando, ratos Wistar submetidos a exercício voluntário na roda de atividade, durante 5 semanas, apresentaram alteração benéfica na composição da microbiota cecal provocada pela elevação de bactérias produtoras de n-butirato do gênero *Lactobacillus*, ácido graxo de cadeia curta, que pode atuar, mais distalmente, por meio da sua atividade anti-inflamatória, bem como por ser considerado substrato energético preferencial para células epiteliais da mucosa do cólon¹². Este último estudo também detectou presença no conteúdo cecal de ratos de outros microrganismos tais como, *Ruminococcus hydrogenotrophicus* e *Clostridium* sp. Ademais, o exercício voluntário atenuou efeitos deletérios na MI cecal de camundongos, previamente submetidos a administração de bifenilos policlorados (da sigla em inglês, PCBs), agente toxicante que prejudica a função intestinal. Quando comparado ao grupo sedentário, que também recebeu dose de PCBs, os ratos exercitados apresentaram diversidade microbiana maior, especialmente pela maior abundância relativa de bactérias da ordem Lactobacillales, microrganismos benéficos para manutenção da higidez e função imune da mucosa colônica¹³.

Pesquisadores propuseram que a diversidade da MI pode ser empregada como indicador de saúde do hospedeiro, notadamente no que diz respeito à elevação de índices de α e β diversidade, tais como o índice de Shannon, Chao 1 e Simpson^{7,9,14}. Recentemente, camundongos livres de germes (Germfree) foram transplantados com

fezes de indivíduos da espécie humana com baixo ou elevado índice de massa corporal (IMC). Apesar da ausência de diferença estatística na maioria dos índices relacionados tanto com alfa como beta diversidade entre os grupos experimentais, o gênero *Prevotella* foi encontrado numa maior proporção, tanto nos indivíduos doadores com menor IMC como nos camundongos que receberam conteúdo fecal destes indivíduos. Interessante, estes mesmos camundongos revelaram incremento da força muscular medido por meio do teste de força de preensão⁶.

A partir do cenário anteriormente mencionado, não há dúvida que existe interesse acadêmico sobre a tríade treinamento-aptidão física-MI. Na tentativa de melhorar a aptidão física dos atletas, incrementos na intensidade e volume de treino são costumeiramente prescritos por treinadores. Assim, quando ocorre intensificação contínua do treinamento associada à prescrição incorreta da recuperação, os atletas podem evoluir para um estado extremo de overreaching não funcional (NFOR), também conhecido como a clássica condição, síndrome do overtraining (SOT)¹⁵. Esta condição clínica promove estagnação ou redução no desempenho, estado que pode perdurar semanas ou meses, mesmo associado a períodos de recuperação¹⁶. Esta manifestação clínica pode possuir etiologia multifatorial, podendo provocar alterações endócrinas, fisiológicas e comportamentais, especialmente redução do desempenho de atletas de alto nível, que estão no “limite fisiológico e psíquico”¹⁷. Tendo em vista o conflito de conceito e nomenclatura observados na vasta literatura sobre a SOT, para realização do presente estudo seguimos posicionamento da Joint Consensus Statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine¹⁶.

Alternativamente, quando o equilíbrio entre a elevação da intensidade do treino e o período de recuperação for insuficiente, pode ocorrer, no curto prazo, condição conhecida como overreaching funcional (FOR)¹⁸. Interessante, esta condição pode ser incluída no planejamento do programa de treinamento, sendo considerada estratégia de condicionamento, pois promove redução, que pode ser reversível, da aptidão física¹⁹, notadamente quando são prescritos subsequentemente períodos de recuperação, em dias ou semanas. Este efeito é conhecido como supercompensação¹⁶, ou seja, passado o período de recuperação ocorre aumento da aptidão física do atleta, quando comparado aos níveis anteriores.

A SOT pode ser estudada em modelos experimentais com roedores, já que estes permitem análises de amostras da MI que podem contribuir com a elucidação de mecanismos envolvidos na dinâmica da biodiversidade bacteriana cecal²⁰. Até onde nosso conhecimento atinge, parece não haver estudos experimentais com roedores que investigaram o efeito de um protocolo de treino, com potencial para induzir as condições FOR ou NFOR/SOT, sobre a microbiota cecal. Deste modo, a hipótese desta pesquisa é que a condição NFOR/SOT induz redução da diversidade, no que tange à riqueza e uniformidade, da comunidade bacteriana cecal, além de provocar modificações na taxonomia da microbiota do conteúdo cecal de ratos. Assim, o presente estudo objetivou aplicar em ratos Wistar um protocolo de treino do tipo endurance para provocar as condições NFOR/SOT ou FOR diagnosticada por meio da análise longitudinal do desempenho e examinar possíveis efeitos agudos destes estados sobre a microbiota cecal de ratos Wistar.

2. Material e métodos

2.1 Localização

O experimento foi realizado a partir da interação acadêmica de dois laboratórios. O manejo, testes de esforço máximos e prescrição do protocolo de condicionamento físico para indução das condições FOR ou NFOR/SOT foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ). A extração de DNA, o sequenciamento, da mesma maneira que as análises de bioinformática foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), ambos localizados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Campus de Jaboticabal/SP. Os procedimentos experimentais realizados foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FCAV) de acordo com o protocolo nº 23593/15.

2.2 Animais e período de adaptação

Inicialmente utilizaram-se 100 ratos (*Rattus norvegicus* Sprague-Dawley, linhagem Wistar) machos, jovens, massa corpórea (MC) entre 150 e 200 g, obtidos do Biotério Central da UNESP - Botucatu e mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UNESP - Jaboticabal. Somente a equipe de pesquisadores manipulou os animais sob condições controladas laboratoriais, que estava equipado com ventilação adequada. Os ratos foram mantidos numa temperatura ambiente média de 23°C, num biotério de manutenção com ciclo de claro-escuro invertido 12:12 h (luz das 18:00 - 6:00

h). Ração comercial (Labina Presence Ratos e Camundongos®), para roedores e água foram fornecidos "*ad libitum*".

2.3 Treinamento de resistência para indução do *overtraining*

A **Tabela 1** e a **Fig. 1** revelam as etapas do protocolo de indução de *overtraining*, sendo que este foi adaptado de estudo previamente publicado²¹ Cabe informar que para o presente estudo algumas etapas adicionais foram incluídas, tais como período de habituação durante 3 semanas nas quais os ratos foram expostos à esteira desligada (AVS - São Carlos/SP - Brasil), 1 vez por dia, pelo período de 10 min. Ato contínuo foi realizado período adaptativo, com a esteira ligada, por 3 semanas numa velocidade média de 12 m.min⁻¹ durante 10 min. Ademais, houve adição de 1 semana no protocolo de indução de *overtraining*. Ao final desta etapa foram excluídos 25 ratos que não andaram voluntariamente na esteira. Após o período adaptativo, os ratos foram submetidos ao protocolo de indução do *overtraining* por 12 semanas, distribuídas em 5 fases (F1-F5). A prescrição de treino foi de 5 dias consecutivos de sessões de exercício, com 2 dias subsequentes de repouso para recuperação. As sessões de treino ocorreram no ciclo escuro, correspondente ao período de atividade dos ratos. A F1 foi composta por 4 semanas, onde realizou-se incremento tanto na velocidade como na duração de cada sessão, com objetivo de aumentar a adaptação à esteira e a aptidão física dos ratos. Na F2, a velocidade e a duração alcançadas ao final da F1 foram mantidas por mais 4 semanas. Nas 4 últimas semanas subsequentes (F3, F4 e F5), a frequência de sessões diárias foi aumentada para 2, 3 e 4 vezes e o período de recuperação entre estas foi

restringido a 4, 3 e 2 horas. O propósito destas fases foi promover desequilíbrio no ciclo treino-recuperação.

Tabela. 1. Protocolo de treino para indução do *overtraining*.

Etapas	Semana	Horário	Velocidade (m min⁻¹)	Time (min)	Frequência diária	Recuperação (h)
Habituação	1 ^a	13:00-14:00	0	10	1x	24
	2 ^a	13:00-14:00	0	10	1x	24
	3 ^a	13:00-14:00	0	10	1x	24
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 (P1)	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
	5 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
Fase 2 (P2)	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 (P3)	9 ^a	6:00-18:00	25	60	2x	4
Fase 4 (P4)	10 ^a	6:00-18:00	25	60	3x	3
Fase 5 (P5)	11 ^a	6:00-18:00	25	60	4x	2
	12 ^a	6:00-18:00	25	60	4x	2

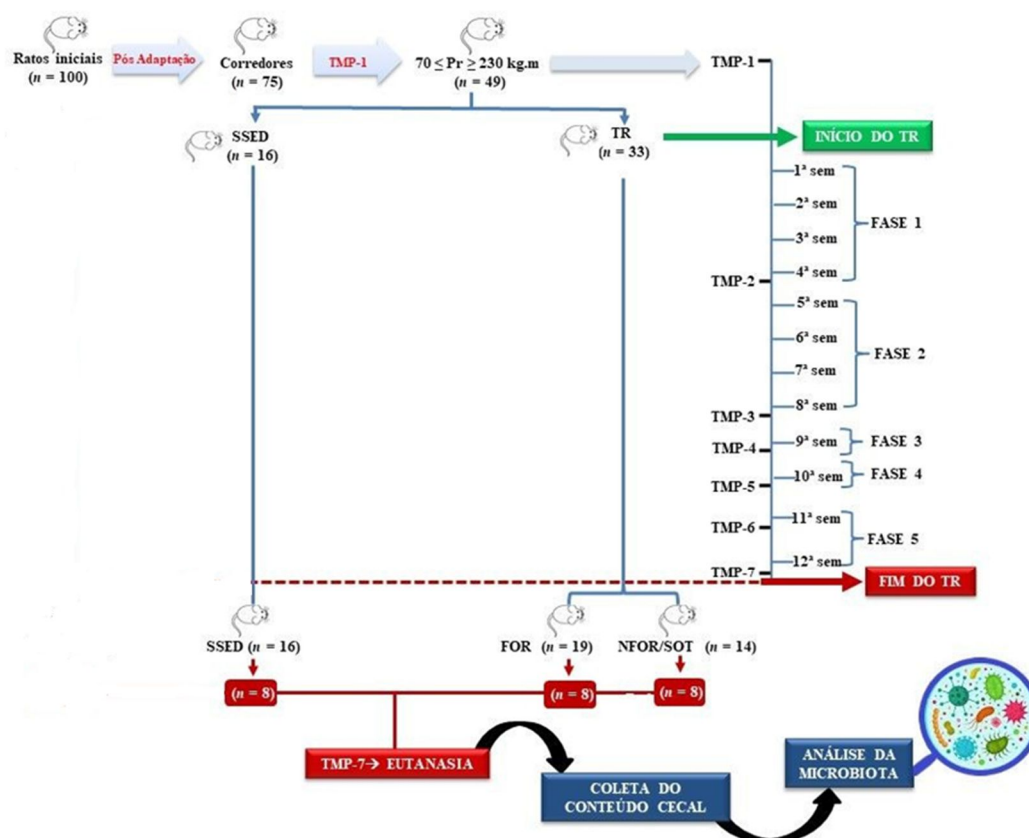


Figura 1. Fluxograma do protocolo experimental. SSED= semi-sedentário, realizou condicionamento moderado; TR=grupo treinado, ratos submetidos ao treinamento de resistência para indução do *overtraining*; FOR = *overreaching funcional*; NFOR/SOT = *overreaching não-funcional*. TMP= teste máximo de performance. Para análise da microbiota realizou-se sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA pelo Illumina.

2.4 Teste máximo de performance (TMP)

Para avaliação da aptidão física dos ratos ao longo do protocolo de indução foram aplicados sete TMPs (Hohl et al., 2009). Os testes foram realizados 60 h após a última sessão de treino semanal, sendo que os ratos retornaram às suas atividades após quarenta e oito horas de repouso. Os TMPs iniciaram sempre numa velocidade de 12 m min^{-1} , a qual foi aumentada 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 para 2 m min^{-1} a cada 3 min²³. Este acréscimo foi mantido até que os ratos atingissem a exaustão, caracterizada quando tocassem a porção traseira da esteira cinco vezes no período de 1 min. Os TPs foram realizados no início do experimento (TMP-1) e após a 4° (TMP-2), 8° (TMP-3), 9° (TMP-4), 10° (TMP-5), 11° (TMP-6) e 12° (TMP-7) semana de treinamento. Todos os ratos foram pesados imediatamente antes dos TMPs, sendo que as massas corpóreas foram utilizadas para o cálculo do desempenho.

2.5 Determinação do desempenho

O desempenho de cada rato foi utilizado para posterior classificação destes em FOR ou NFOR. Assim, para quantificação do desempenho de cada indivíduo aplicou-se modelo massa-dependente²¹. Tal procedimento considera todas as forças relativas à massa corpórea e 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 etapa²¹. O desempenho foi expresso em quilogramas-metros (kg.m), como exemplificado na seguinte equação:

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

Onde: D= desempenho do rato; D_i = desempenho do rato em cada etapa do teste de desempenho; m= massa corpórea; 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.

Também foi quantificada a velocidade máxima (V_{max}) atingida nos TMP, variável que representa adaptação metabólica anaeróbia em resposta ao condicionamento físico.

2.6 Grupos experimentais

Os ratos que obtiveram desempenho entre 70 e 230 kg m ($n=49$) no TMP-1 foram selecionados para o experimento. Eles foram mantidos numa densidade populacional de 4 a 5 ratos/caixa (414 x 344 x 174 mm) de polipropileno para manutenção de roedores (Bonther *growing*®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Destes animais, dezesseis foram aleatoriamente selecionados para compor o grupo semi-sedentário (SSED, $n=16$), que realizou condicionamento moderado, composto por uma sessão por dia, duas vezes por semana numa intensidade de 12 m.min⁻¹. O restante dos ratos compôs o grupo treinado (TR, $n=33$), sendo submetidos ao treinamento de resistência para indução do *overtraining*. Os valores obtidos no TMP-7 (**Fig. 2**) foram utilizados para distinção do grupo TR em ratos FOR ou NFOR/SOT. Para tanto, quantificou-se o grau de inclinação (α) obtido por meio de função linear ($y = ax + b$), elaborada a partir dos resultados dos desempenhos obtidos nos testes

TMP-2, TMP-3, TMP-4, TMP-5, TMP-6 e TMP-7. O valor para separação em FOR ou NFOR/SOT foi baseado nos valores de α obtidos no grupo SSED ($14,38 \pm 15,36$ kg m). Portanto, o α crítico para distinção foi estabelecido a partir do valor médio dos indivíduos do grupo SSED menos 1 DP²¹, onde obteve-se α crítico de - 0,98 kg m. Como observado na **Figura 2**, os ratos com $\alpha < -0,98$ kg m foram classificados como NFOR/SOT (n=14) e os ratos com $\alpha > -0,98$ kg m como FOR (n=19).

Ato contínuo, os ratos de cada grupo foram submetidos a eutanasia logo após o TMP-7, para obtenção das amostras do conteúdo cecal de cada animal. A seguir, as amostras foram acondicionadas em criotubos e armazenadas em freezer - 80°C. Para tanto, aproximadamente duas horas após o TMP-7, os ratos foram anestesiados via intraperitoneal, com associação anestésica que continha cetamina (Centamin® 10%, Syntec, Barueri, SP, Brasil), xilazina (Xilazin® 2%, Syntec, Barueri, SP, Brasil) e acepromazina (Apromazin® 1%, Syntec, Barueri, SP, Brasil) nas doses de 5.56, 0.55 e 0.11mg kg⁻¹, respectivamente²². Importante informar que, para o presente estudo, foram utilizados apenas oito ratos de cada condição experimental, sendo que o restante foi utilizado para compor outros estudos do nosso grupo de pesquisa.

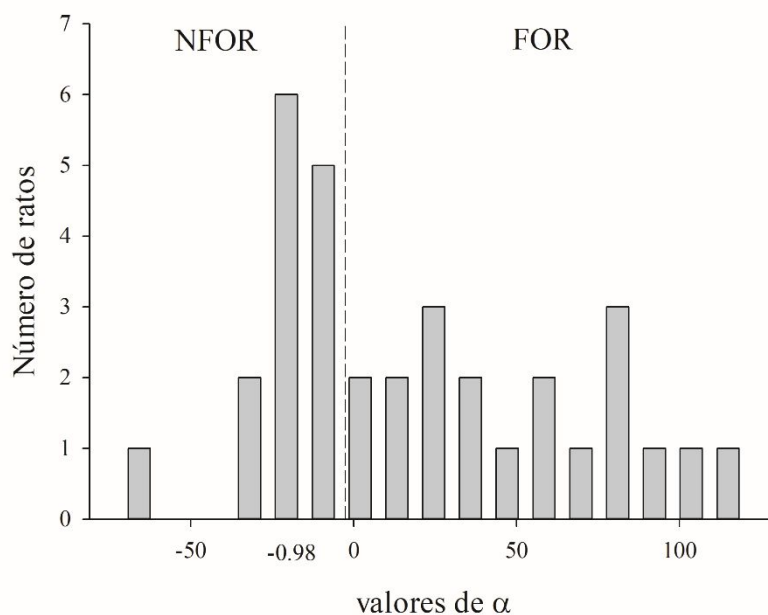


Figura 2. Histograma de distribuição dos grupos; overreaching não funcional (NFOR/SOT, $n = 14$) e overreaching funcional (FOR, $n = 19$). A linha tracejada indica o α crítico de $-0,98 \text{ kg m}$ utilizado para classificação dos subgrupos FOR e NFOR.

2.7. Extração do DNA e sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA pelo Illumina

O conteúdo cecal foi obtido 60 min após o TMP-7, sendo que o DNA microbiano foi extraído por meio da utilização do kit FastDNA SPIN for soil (Mpbio®). A quantificação e a qualidade do DNA foram determinadas por meio de espectrofotometria (NanoDrop®, Thermo Fisher Scientific). Por conseguinte, a integridade do material genético foi definida em gel de agarose 1%, sendo uma alíquota de 5µL da solução de DNA metagenômico, com 3µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol [p:v] e 50% de glicerol [v:v]) submetida à eletroforese horizontal com tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) corado por *sybr gold* (0,5 µg/mL) (Invitrogen®), em torno de 2 h, numa voltagem constante de 80 V. As concentrações finais de DNA foram diluídas para 20 ng/µL. A qualidade do material genético extraído foi avaliada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo 800 Scientific) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, sendo a relação 260/280 utilizada para estimar a pureza do DNA. E a concentração de DNA desse material foi feita no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com o kit Qubit™ DNA BR Assay Kit (Invitrogen®), seguindo-se as recomendações do fabricante.

A amplificação das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA foi realizada após o processo de extração, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) a 95°C por três minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 90 segundos e 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por cinco minutos, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGCTAA-3') e 926R (5'-

GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')²³. As reações de PCR e a integridade dos fragmentos amplificados foram feitas de acordo com Fernandes et al. (2018)²⁴.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery w/ Zymo-Spin™ IC Columns (Zymo Research, Irvine, CA) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação das amostras/bibliotecas utilizando o KAPA Library Quantification Kit Illumina® por PCR quantitativa seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas purificadas e quantificadas foram misturadas de maneira equimolar e sequenciadas (2x250pb) com o MiSeq® Reagent Kit v2 (500 ciclos) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando-se a plataforma Illumina. As sequências foram analisadas utilizando o programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) versão 1.9.1²³, sendo que sequências com tamanho menor que 150-200pb e quimeras detectadas foram eliminadas. Para alinhamento das sequências de alta qualidade e, conseqüentemente, obtenção da designação taxonômica e a abundância relativa dos diferentes grupos bacterianos, utilizou-se *Ribosomal Database Project* (RDP-II)²⁵ como banco de dados. Os alinhamentos resultantes foram utilizados na construção da matriz de distância e para agrupar as sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs).

2.8. Bioinformática

Os conjuntos de dados avaliados quanto à qualidade utilizando FastQC e *fastx_info* do conjunto de ferramentas do pacote USEARCH (v11.0.667)²⁶. Os *primers* foram removidos das sequências utilizando a ferramenta *fastx_truncate* e os parâmetros de distribuição do tamanho das sequências e o erro esperado das leituras por biblioteca

foram obtidos por meio da ferramenta *fastq_eestats2* ambos pertencentes ao pacote de ferramentas do USEARCH (v11.0.667)²⁶. Para análise do microbioma cecal dos ratos, utilizamos o pipeline Devisive Amplicon Denoising Algorithm - *dada2* (v1.14.1)²⁷ (disponível em <https://github.com/benjjneb/dada2>) para inferir e quantificar ASVs (Amplicon Sequence Variants) no R (v3.6.3)²⁸. As leituras brutas foram truncadas nas posições de 220 pb (forward) e 210 pb (reverse); usando a função *filterAndTrim* com parâmetros padrão (*maxN* = 0, *truncQ* = 2 e *maxEE* = 2), leituras inferiores a do parâmetro de truncagem foram descartadas. A taxa de erro por amostra foi estimado baseado no modelo de erro realizado pela função *learnErrors* em seguida as *reads* foram dereplicadas. Por fim as sequências *forward* e *reverse* foram fundidas com sobreposição em 12 bases e sequências quimericas foram removidas. A atribuição taxômica dos ASVs montados foram realizados pelo classificador Naive Bayesian (implementado no DADA2) usando o conjunto de treinamento do banco de dados SILVA versão 132²⁹. As ASVs que apresentavam abundância menor que 4 *reads* e que não estavam presentes em pelo menos 15% das amostras foram descartadas das análises e os dados foram normalizados usando o pacote DESeq2 (v1.26.0)³⁰. Para manipulação geral dos dados e análises estatística, utilizamos os pacotes Phyloseq (v1.30.0)³¹ e Vegan (v2.5.6)³² no R. A análise de espécie indicadora foi realizada pelo pacote labdsv (v2.0.1) por meio da função *indival*.

2.9 Análises estatísticas

A análise estatística para comparação do desempenho (D) e da velocidade máxima (Vmax) dos grupos foi realizada pelo programa Sigma Plot 12.0. Aplicou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste post hoc de Holm-Sidak para comparação das médias. Os índices de α diversidade foram comparados aplicando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As comparações pareadas para os índices de Alfa-diversidade foram realizadas utilizando o pacote ggpubr (v0.2.5) usando a função '*stats_compare_means*' aplicando teste Wilcoxon, enquanto que para o índice de beta-diversidade realizamos a análise de permutação multivariada (PERMANOVA) usando a função '*adonis*' implementado no pacote de análises do Vegan (v2.5.6)³². A abundância diferencial de táxons foi realizada pelo pacote de DESeq2³¹. Para todas as análises estabeleceu-se 5% como nível de significância ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Efeito do treinamento

Após o período de treinamento, especificamente após o TMP-7, foi evidenciado que os animais do grupo TR se subdividiram em dois sub-grupos com capacidades físicas distintas. Assim, para confirmação das condições FOR e NFOR/SOT utilizamos o desempenho (D) no grupo TR, obtido a partir dos TMPs, sendo que a **Fig. 3** revela a comparação dos grupos SSED, FOR e NFOR/SOT. Houve aumento ($P < 0.001$) do D para o grupo FOR (559 ± 52 kg m), quando comparado aos outros grupos. Interessante, o grupo NFOR/SOT obteve desempenho semelhante ao grupo SSED com

desempenhos correspondentes a 230 ± 16 kg m e 292 ± 36 kg m, respectivamente. FOR obteve maior Vmax quando comparado aos grupos SSED e NFOR/SOT. A **Fig. 4** revela o *box plot* que compara a variação de massa corpórea entre os diferentes grupos no momento do TMP-7. O sub-grupo NFOR mostrou massa corpórea menor que SSED ($P = 0,020$). FOR revelou massa corpórea menor que SSED ($P = 0,004$).

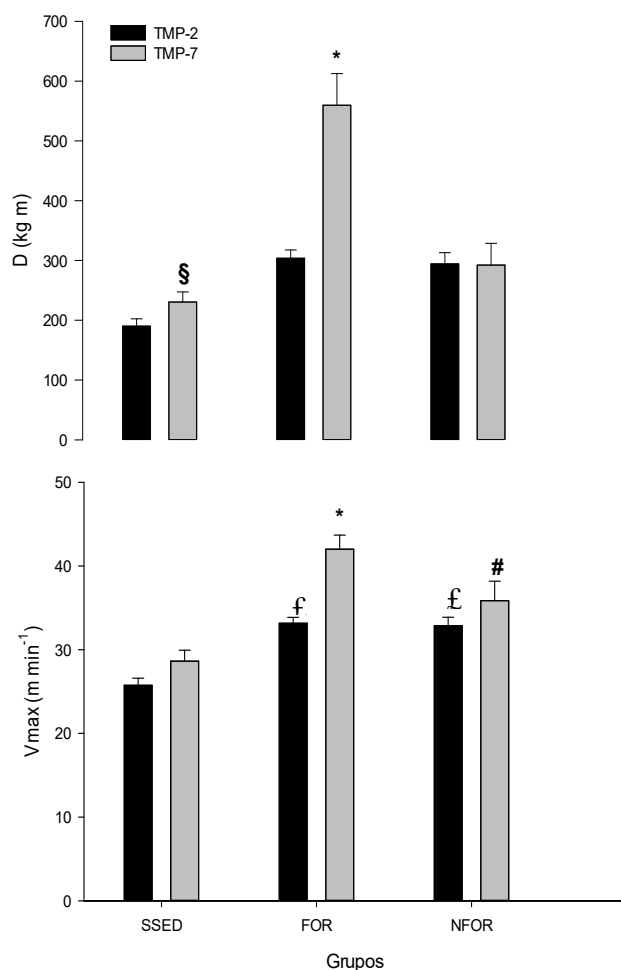


Figura 3. Desempenho (D) e velocidade máxima (Vmax) atingida pelos ratos nos testes máximos de performance 2 (TMP-2) e 7 (TMP-7). *Indica aumento de D e Vmax para o grupo FOR, quando comparado com os grupos SSED e NFOR/SOT. # Indica que NFOR/SOT foi maior que SSED. £ Indica aumento de FOR e NFOR/SOT em relação a SSED. § Indica tendência de aumento ($P=0,058$) do desempenho de SSED (TMP-2 vs TMP-7). SSED=grupo semi-sedentário; FOR=*overreaching* funcional; NFOR/SOT=*overreaching* não-funcional/síndrome de *overtraining*.

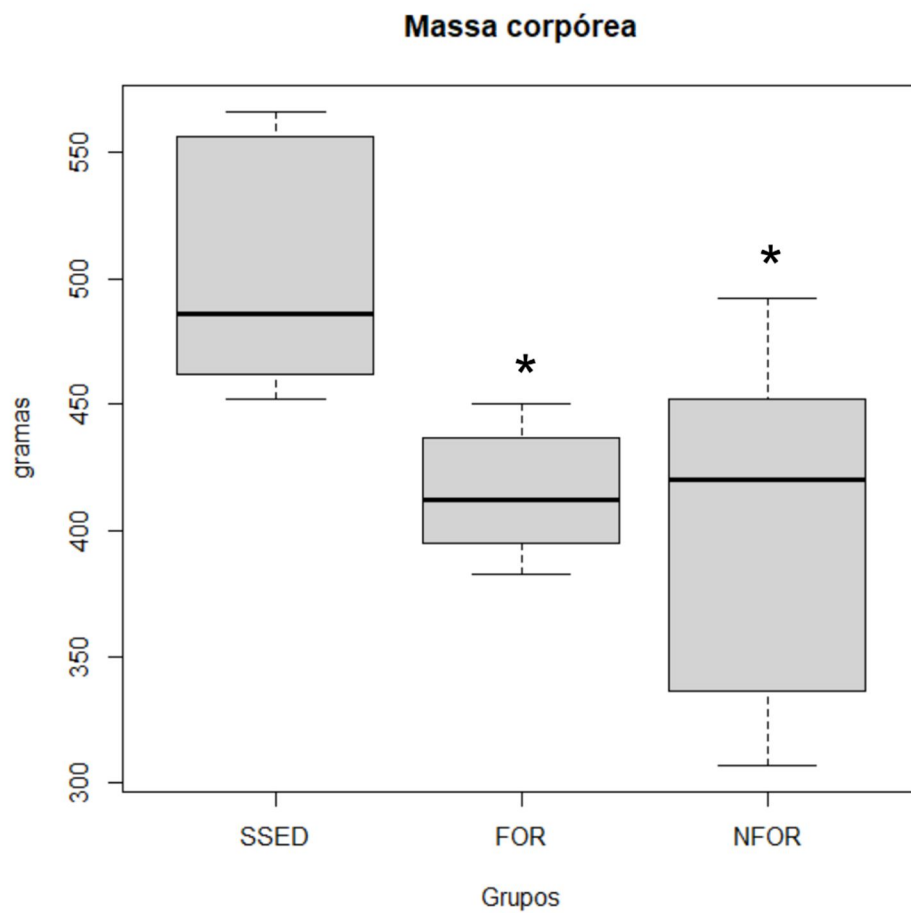


Figura 4. Massa corpórea no TMP-7. *Indica que a massa corpórea foi menor para FOR e NFOR em relação a SSED; SSED= grupo semi-sedentário; FOR = overreaching funcional; NFOR/SOT = overreaching não-funcional/síndrome de *overtraining*.

3.2 Composição da microbiota cecal

3.2.1. Métricas

Para comparar a comunidade microbiana do ceco de ratos SSED, FOR e NFOR/SOT, foi utilizado sequenciamento de nova geração direcionado a regiões hipervariáveis V4 dentro dos genes microbianos de 16S rRNA²³. O sequenciamento Illumina das bibliotecas de amplicons da região 16S rRNA V4/V5 gerados a partir de 8 SSED, 8 NFOR/SOT e 8 FOR gerou 676.152 pares de leituras brutas dos quais 537.070 passaram pelas etapas de controle de qualidade.

3.2.2. Taxonomia e diversidade entre SSED, FOR e NFOR/SOT

Identificaram-se características distintivas da microbiota cecal aproximadamente 30 min após o TMP-7, sendo definidas assinaturas taxonômicas nas diferentes condições. Deste modo, o perfil microbiano das condições experimentais (grupos SSED; sub-grupos FOR e NFOR/SOT) permitiu a identificação de dez diferentes filos bacterianos (**Fig. 5A**). Na comparação com SSED, ratos NFOR/SOT apresentaram menores quantidades do filo *Proteobacteria* (**Fig. 6A**), ao passo que o grupo FOR revelou maior AR% de *Firmicutes* (**Fig. 6B**). Não houve alteração no filo Bacteroidetes (**Fig. 6C**). Encontraram-se 21 gêneros (**Fig. 5B**). Os gêneros *Alistipes* e *Allobaculum* foram encontrados somente nos grupos SSED e NFOR/SOT, respectivamente. De uma maneira geral, houve significativa AR% de bactérias do gênero *Anaerobiospirillum*, em todos os grupos experimentais. Comparando os grupos experimentais entre si, os ratos

que compuseram os grupos FOR e NFOR/SOT apresentaram maior AR% de *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Ruminococcaceae* e *Treponema*, em relação ao grupo SSED. O gênero *Christensenellaceae* foi encontrado somente nos grupos FOR e NFOR/SOT. A **Fig. 7** revela os índices de α -diversidade da microbiota do conteúdo cecal dos ratos submetidos às condições SSED, FOR e NFOR/SOT. A análise dos grupos experimentais indicou que o grupo NFOR/SOT, quando comparado ao grupo SSED, mostrou valores menores ($p < 0,05$) nos índices *Observed* (**Fig. 7A**), *ACE* (**Fig. 7B**), *Chao1* (**Fig. 7C**), *Fisher* (**Fig. 7G**) e PD (**Fig. 7H**). Em relação à análise de β -diversidade (**Figs 8A e 8B**), os gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA) bidimensional (**Fig. 8A**) e tridimensional (**Fig. 8B**), obtidos com base na permutação multivariada (PERMANOVA), revelaram a formação de dois agrupamentos relacionados aos perfis das comunidades bacterianas das condições SSED, FOR e NFOR/SOT, sendo que num agrupamento observamos a presença de ratos do grupo NFOR/SOT.

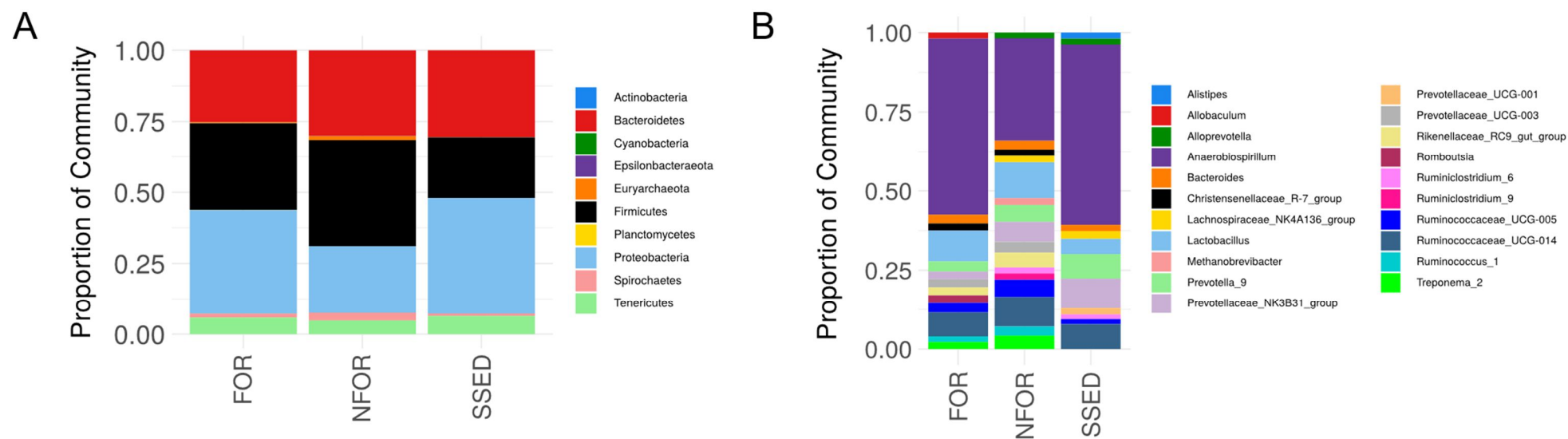


Figura 5. Em (A) Abundância relativa de filos bacterianos. (B) Abundância relativa de gêneros bacterianos. As diferentes cores correspondem aos filos e gêneros bacterianos. Retângulos representam filos e gêneros específicos organizados em ordem de abundância.

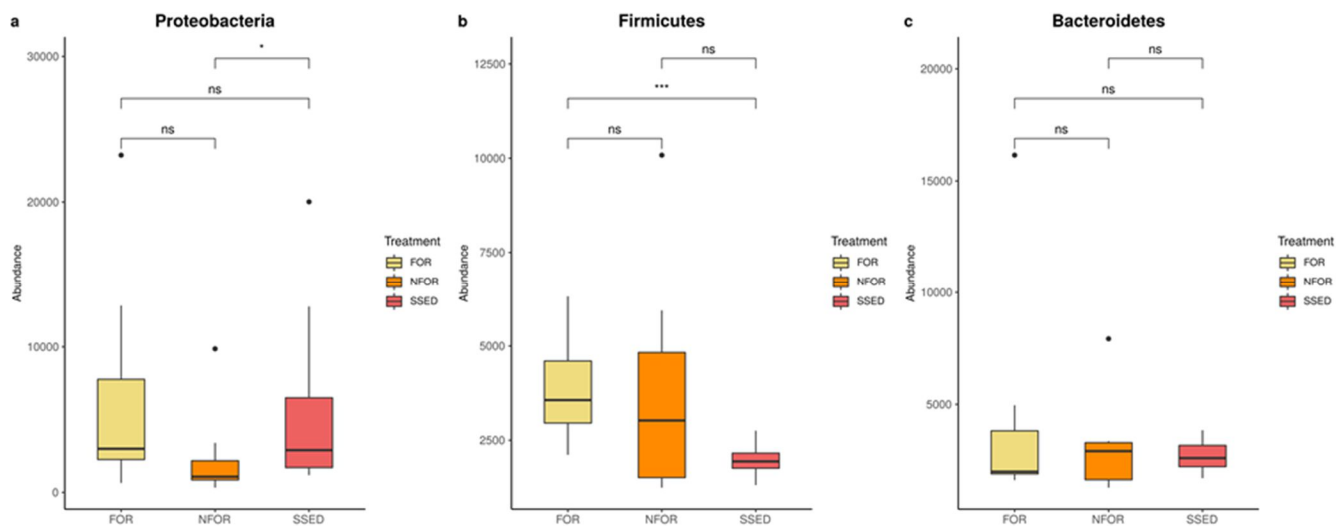


Figura 6. Abundância relativa no nível filo. FOR (amarelo, n = 8), NFOR/SOT (laranja, n = 8), semi-sedentário -SSED (rosa escuro, n = 8). * Indica diferença pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

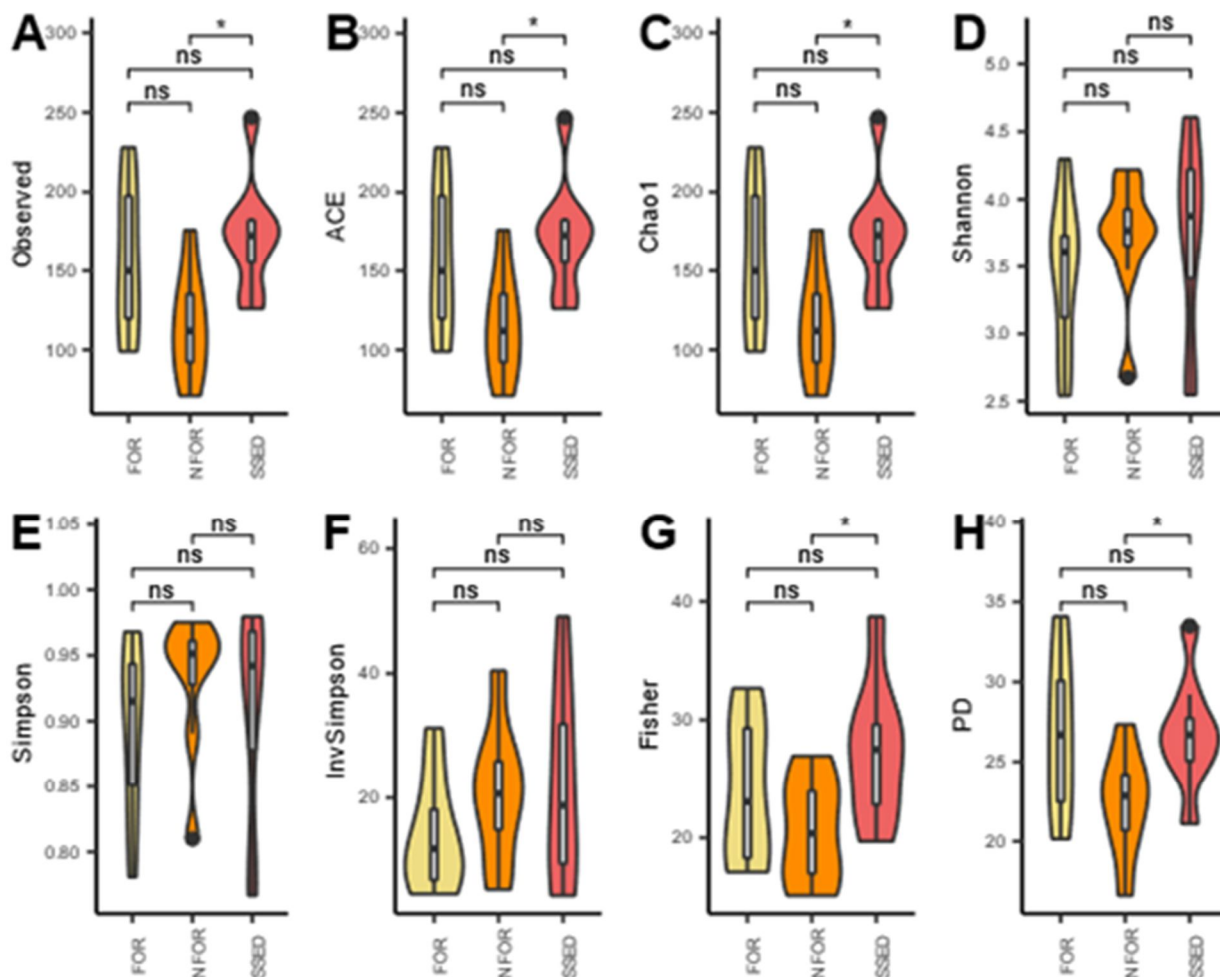


Figura 7. Diversidade alfa no nível da ASV (Amplicon Sequence Variation). FOR (amarelo, n = 8), NFOR/SOT (laranja, n = 8), semi-sedentário (SSED, rosa escuro, n = 8). *Indica diferença entre os grupos pelo teste de Wilcoxon, ($p < 0,05$).

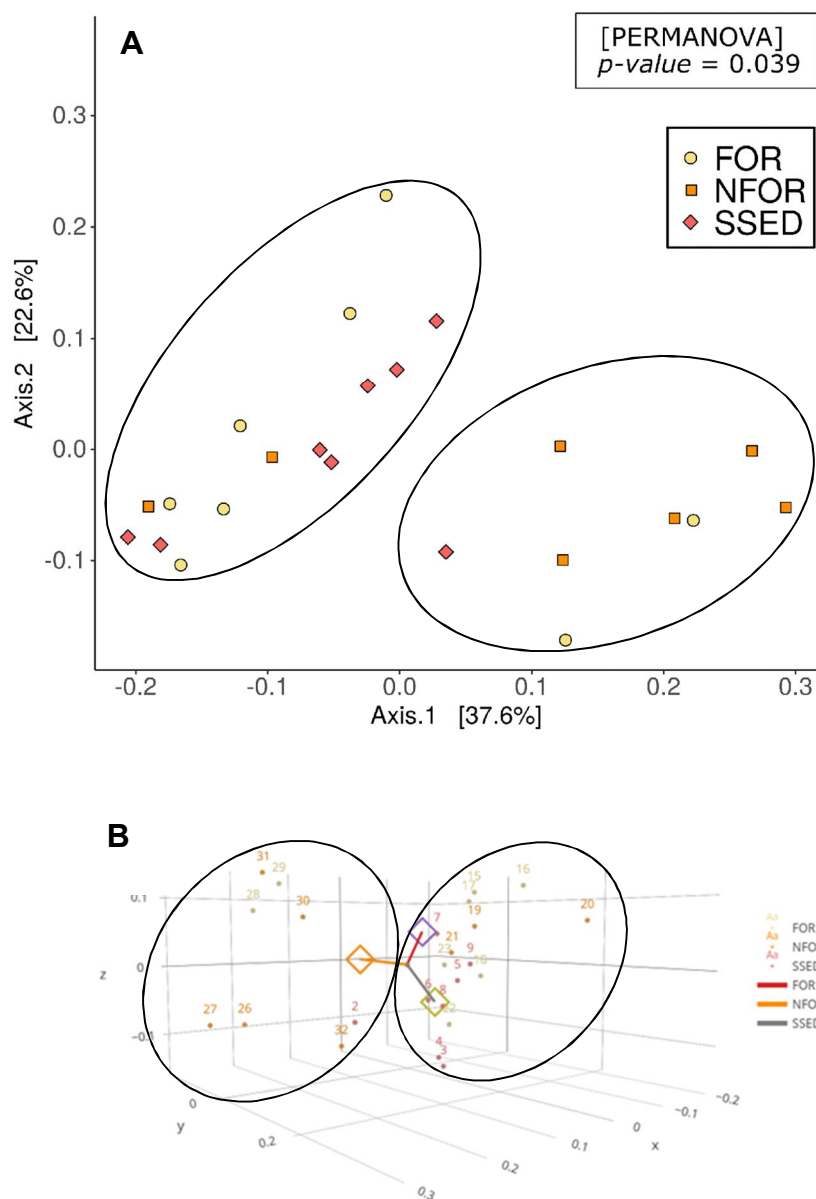


Figura 8. Diversidade beta. Gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA) bidimensional (A) e tridimensional (B) a partir da análise de permutação multivariada (PERMANOVA) usando função 'adonis' implementado no pacote de análises do Vegan (v2.5.6).

4. Discussão

Este estudo examinou efeitos agudos do exercício máximo em esteira sobre a microbiota cecal de ratos Wistar machos que realizaram treino prolongado e intenso, do tipo *endurance*. O desempenho dos ratos foi avaliado longitudinalmente para caracterização das condições FOR e NFOR, sendo que estudos científicos sobre MI de animais de laboratórios estão aumentando nos últimos anos, fornecendo conhecimento interdisciplinar sobre este tema. É importante compreender a dinâmica da MI dos animais de laboratório, tendo em vista que estes rotineiramente são utilizados nos modelos pré-clínicos para estudos de MI humana³³.

Aplicou-se aqui protocolo de treinamento padronizado, composto por períodos de desequilíbrio entre sessões de exercício e repouso, que foi reproduzido a partir de estudo previamente publicado²¹, que induziu a condição de NFOR ou *overtraining* em ratos Wistar. Essencialmente, esta condição foi diagnosticada pela redução do desempenho, sendo este estado imputado na literatura como obrigatoriamente associado com a NFOR/SOT¹⁶. Os ratos classificados como FOR revelaram evidente elevação de desempenho. Ademais, nossos resultados revelaram que a composição da comunidade microbiana cecal dos ratos foi altamente individualizada, sob condições de aptidão aeróbia distintas, no que diz respeito a presença, ausência ou abundância dos microrganismos.

Nos últimos anos, alguns estudos demonstraram que a atividade física pode modular a diversidade e composição da MI de ratos hígidos³⁴, assim como modificar a comunidade microbiana de ratos obesos ou hipertensos¹⁰. Em contrapartida a estes estudos prévios, que usaram eletroforese em gel com gradiente de temperatura - PCR-TGGE²⁵, eletroforese em gel com gradiente desnaturante-PCR-DGGE³⁴ e pirosequenciamento Roche 454-A¹⁰, no presente estudo, foi utilizado sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequence* - NGS), metagenômico de *amplicon* pela plataforma Illumina MiSeq utilizando a região gênica 16S rRNA V4/V5.

O conceito que níveis regulares e, até mesmo elevados, de exercício físico pode auxiliar na manutenção e equilíbrio da MI ganhou impulso recentemente, sendo que

a α -diversidade bacteriana elevada é consistentemente associada com a saúde do hospedeiro³⁵. De modo geral, fisiologistas conhecem há muito tempo que a atividade física regular pode influenciar positivamente os indivíduos da espécie humana, especialmente a musculatura esquelética e o sistema cardiovascular. No que concerne o TGI, a literatura é relativamente paradoxal^{36,37}. Do ponto de vista epidemiológico, existem evidências que o exercício extenuante e prolongado pode provocar alterações maléficas no TGI³⁸. Em contrapartida, alguns estudos indicaram que a prática de exercício regular pode reduzir a incidência de enfermidades intestinais²⁹, sendo comum encontrar indícios que a associação entre prática de exercício regular e, até mesmo intenso, pode elevar a α diversidade da MI^{9,35}.

Neste contexto, cabe destacar que os ratos do grupo SSED fizeram exercício somente duas vezes por semana, numa velocidade relativamente moderada de 12 m min⁻¹ sendo que apresentaram índices de diversidade tais como “Observed”, ACE, Chao 1, Fisher e PD maiores em relação ao grupo NFOR/SOT. De certa maneira, este resultado revelou que indivíduos sob condição NFOR/SOT podem ser mais susceptíveis à enfermidades do TGI, pois riqueza e uniformidade reduzidas são fatores que predispõe às doenças gastrintestinais, como a doença inflamatória intestinal em indivíduos da espécie humana³⁶. Assim, a quantidade de exercício realizada pelo grupo NFOR/SOT foi suficiente para provocar efeitos indesejáveis sobre a diversidade α da microbiota cecal. Esta situação não foi observada nos ratos do grupo FOR, a despeito de que não foi encontrado diferença entre as duas condições estudadas aqui.

Complementando este raciocínio acima, os resultados da diversidade β , que determina a distância filogenética compartilhada entre as amostras, efetivamente medindo o número de comunidades distintas numa determinada região, mostraram distinção relativa dos indivíduos. Claramente, notamos a formação de agrupamento formado em sua maioria por indivíduos do grupo NFOR/SOT. Desta maneira podemos afirmar que houve diferença entre a composição das comunidades bacterianas, provavelmente devido a presença de bactérias raras, tendo em vista que

análise de diversidade β , circunstancialmente, pode diferenciar comunidades bacterianas por meio da presença de linhagens de bactérias incomuns³⁹.

Ao contrário de estudo prévio³⁶, que examinou a relação entre exercício realizado na esteira e a microbiota cecal de camundongos C57BL/6J, o presente estudo revelou que os grupos FOR e NFOR/SOT tiveram redução da abundância do filo de bactérias gram negativas, o *Proteobacteria*. Este filo atingiu, inesperadamente, abundância relativa mais elevada na condição SSED. Estes resultados são contraditórios, tendo em vista que o incremento destas bactérias está frequentemente relacionado diretamente com aumento de massa magra em indivíduos que perdem peso ou em camundongos obesos suplementados com prebióticos a base de oligofrutose, existindo o conceito que tanto roedores como humanos possuem relação inversa entre ganho de peso e a proporção deste filo ou gênero⁴⁰. Os ratos que manifestaram a condição SSED tiveram massa corpórea maior. Este achado pode sugerir que indivíduos intensamente treinados, como nas condições FOR e NFOR/SOT perdem peso independente da presença abundante do filo *Proteobacteria*, sendo que este resultado poderia ser considerado possível adaptação microbiana ao treinamento intenso e fornece novas linhas de pesquisa sobre este tema.

Ampliando a abordagem sobre o filo *Proteobacteria*, autores de importante revisão da literatura mencionaram que atletas sob SOT, em decorrência de má adaptação fisiológica com decréscimo inexplicado do desempenho, podem manifestar sinais clínicos condizentes com respostas inflamatórias, local e sistêmica¹⁷. Dentro desta contextualização, chama atenção a resposta, algo paradoxal, relacionada com a menor abundância de *Proteobacteria* nos ratos que apresentaram redução da aptidão física (NFOR/SOT). Tal contradição está relacionada com o potencial que as bactérias deste filo têm para liberarem parede celular Gram-negativa, endotoxina primária, os lipopolissacarídeos, que pode gerar resposta inflamatória e endotoxemia. Assim, o aumento induzido de *Proteobacterias* pela atividade física reduzida poderia favorecer maior susceptibilidade dos ratos

semi-sedentários apresentarem risco de enfermidades inflamatórias crônicas⁴¹. Entretanto, esta condição parece não ter sido apresentada pelos ratos NFOR/SOT.

A abundância relativa pode ser utilizada para verificar a interação entre microrganismos, bem como encontrar relações microbianas essenciais para a estrutura e estabilidade desta comunidade, deduzindo a influência de várias interações com o hospedeiro. Aqui, nós utilizamos a AR% para visualizar o impacto das condições FOR ou NFOR/SOT sobre a interação da composição da comunidade microbiana presente no ceco de ratos. Esta análise também foi utilizada para estudo da evolução, conforme avanço da idade, da microbiota ruminal de ovelhas que detectou abundância de alguns gêneros, com destaque para *Lactobacillus* que possui papel na redução no pH do TGI, impedindo a colonização de bactérias nocivas⁴². Ademais, estudo recente indicou que a suplementação por meio de probióticos constituídos por *Lactobacillus* pode melhorar o estresse oxidativo e as respostas inflamatórias induzidos pelo exercício prolongado e intenso⁴³. A partir dos achados obtidos na AR% apresentada aqui, os ratos da condição NFOR/SOT quando comparado àqueles que manifestaram o estado FOR, revelaram abundância levemente maior do gênero *Lactobacillus*, sendo que ambos os grupos tiveram maior abundância deste gênero, quando relacionados ao grupo SSED. A presença deste gênero poderia ser considerada resposta adaptativa benéfica de proteção da mucosa cecal, tendo em vista que, recentemente, pesquisadores mencionaram que a condição de *overtraining* pode provocar comprometimento do sistema imunológico e da função da barreira intestinal⁴⁴. A presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* no trato gastrintestinal pode contribuir com a inibição de patógenos entéricos por meio da produção de ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio⁴⁵.

O estudo adundância relativa revelou outro achado interessante, a presença do gênero *Anaerobiospirillum* na microbiota cecal dos ratos que treinaram intensamente, independente da condição SSED, FOR ou NFOR/SOT. Trata-se de bactérias gram-negativas, anaeróbias, descritas em 1976, comumente encontrada na MI de cães e gatos hígidos e consideradas agente etiológico envolvido com

enfermidades gastrointestinais e quadros clínicos de bacteremia, bem como descrito como causa de infecção articular do joelho periprotética num indivíduo da espécie humana⁴⁶. Cabe ressaltar que, até onde nosso conhecimento atinge, este é o primeiro estudo que descreve a presença de *Anaerobiospirillum* no conteúdo cecal de ratos. Provavelmente, este gênero foi adquirido pelos animais a partir de aquisição ambiental, condição previamente descrita num estudo que verificou a microbiota fecal ao longo da vida útil de ratos de laboratório saudáveis³³. Recentemente, foi demonstrado que o gênero *Anaerobiospirillum* pode contribuir com o metabolismo de glicose, assim como auxiliando na regulação do consumo de energia de camundongos suplementados com dieta composta por alta concentração proteica⁴⁷.

5. Conclusão e implicações

Em síntese, este estudo fornece a primeira evidência que a microbiota cecal pode ser influenciada pelo treinamento intenso. As condições *overreaching* funcional (FOR) ou não funcional (NFOR)/síndrome *overtraining* podem apresentar diferenças e semelhanças na composição e estrutura da MI após exercício intenso. Esta ideia foi amparada pela diversidade α menor, verificada no grupo NFOR, associada pela diferenciação das condições FOR vs NFOR observada na diversidade β . Estas modificações induzidas pelo exercício podem ter implicações na patogênese de algumas enfermidades intestinais, bem como na proteção do TGI. Isto foi evidenciado pelas diferenças nos táxons bacterianos tal como a menor presença filo *Proteobacteria* na condição NFOR. A presença do gênero *Lactobacillus* em ambas as condições pode significar resposta adaptativa protetora do intestino. Importante ressaltar que nós temos ciência da essência descritiva geral e das limitações inerentes deste estudo. Notadamente, esta pesquisa não abordou nenhuma alteração transcricional ou proteica nas comunidades bacterianas. Ao mesmo tempo, os resultados apresentados aqui serão primordiais para desenvolvimento de hipóteses e futuras interações entre a microbiota intestinal de atletas de alto rendimento.

6. Referências

1. Pop M, Walker AW, Paulson J, Lindsay B, Antonio M, Hossain MA, Oundo J, Tamboura B, Mai V, Astrovskaya I, et al. Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition. *Genome Biol*, 2014; 15(6): R76. doi: 10.1186/gb-2014-15-6-r76
2. Gülden E, Wong FS, Wen L. The gut microbiota and type 1 diabetes. *Clin Immunol*. 2015; 159(2): 143-153. doi: 10.1016/j.clim.2015.05.013
3. Yu YN, Fang JY. Gut Microbiota and Colorectal Cancer. *Gastrointest Tumors*. 2015; 2(1): 26-32. doi: 10.1159/000380892
4. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012; 13(9): R79 doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r79
5. Perry RJ, Peng L, Barry NN, Cline GW, Zhang D, Cardone RL, Petersen KF, Kibbey RG, Goodman AL, Shulman GI. Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*. 2016; 534: 213–217 doi: 10.1038/nature18309
6. Fielding, RA, Reeves AR, Jasuja R, Liu C, Barrett B.B, Lustgarten MS. Muscle strength is increased in mice that are colonized with microbiota from high-functioning older adults. *Exp Gerontol*. 2019; 127: 110722. doi: 10.1016/j.exger.2019.110722
7. Clark A, Mach N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. *J Int Soc Sports Nutr*. 2016; 13(1): 43. doi: 10.1186/s12970-016-0155-6

8. De Almeida MLM, Júnior WHF, Carvalho JRG, Rodrigues IM, Jordão LR, Fonseca MG, Rezende ASC, Queiroz-Neto A, Weese JS, Macedo Lemos EG, Ferraz GC Intense exercise and aerobic conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. *PloS one*. 2016; 11(12): e0167108. doi: 10.1371/journal.pone.0167108
9. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, Hayes P, O'Reilly M, Jeffery IB, Wood-Martin R. et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*. 2014; 63: 1913–20. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306541
10. Petriz BA, Castro AP, Almeida JA, Gomes CP, Fernandes GR, Kruger RH, Pereira RW, Franco OL. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. *BMC Genomics*. 2014; 15: 511 doi: 10.1186/1471-2164-15-511.
11. Keohane DM, Woods T, O'Connor P, Underwood S, Cronin O, Whiston R, O'Sullivan, Cotter P, Shanahan F, Molloy MGM. Four men in a boat: Ultra-endurance exercise alters the gut microbiome. *J Sci Med Sport*. 2019; 22(9), 1059-1064. doi: 10.1016/j.jsams.2019.04.004
12. Matsumoto M, Inoue R, Tsukahara T, Ushida K, Chiji H, Matsubara N, Hara H. Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72(2): 572-576. doi: 10.1271/bbb.70474
13. Choi JJ, Eum SY, Rampersaud E, Daunert S, Abreu M T, Toborek, M. Exercise attenuates PCB-induced changes in the mouse gut microbiome. *Environ Health Perspect*. 2013; 121(6): 725-730. doi: 10.1289/ehp.1306534

14. Mach N, Fuster-Botella D. (2017). Endurance exercise and gut microbiota: A review. *Sport Sci Health*. 2017; 6(2): 179-197. doi: 10.1016/j.jshs.2016.05.001
15. Myrick KM. Overtraining and overreaching syndrome in athletes. *J Nurse Pract*. 2015; 11(10): 1018-1022. doi: 10.1016/j.nurpra.2015.08.038
16. Meeusen R, Duclos M, Foster C, Fry A, Gleeson M, Nieman D, Urhausen, A. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome: Joint consensus statement of the European College of Sport Science (ECSS) and the American College of Sports Medicine (ACSM). *Eur J Sport Sci*. 2013. 13(1): 1-24. doi: 10.1249/MSS.0b013e318279a10a
17. Carfagno DG, Hendrix JC. Overtraining syndrome in the athlete: current clinical practice. *Med Sci Sports Exerc*. 2014. 13(1): 45-51. doi: 10.1249/JSR.0000000000000027
18. Aubry A, Hausswirth C, Louis J, Coutts A.J, Buchheit M, Le Meur, Y. (2015). The development of functional overreaching is associated with a faster heart rate recovery in endurance athletes. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0139754. doi: 10.1371/journal.pone.0139754
19. Rietjens GJWM, Kuipers H, Adam JJ, Saris WHM, Van Breda E, Van Hamont D A, Keizer HA. Physiological, biochemical and psychological markers of strenuous training-induced fatigue. *Int J Sports Med*. 2005; 26(1/02): 16-26. doi: 10.1055/s-2004-817914
20. Hold GL. The gut microbiota, dietary extremes and exercise. *Gut*. 2014; 63 (12): 1838-1839. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307305

21. Hohl R, Ferrareso RL, De RO, Lucco R, Brenzikofer R, De Macedo DM. Development and characterization of an overtraining animal model. *Med Sci Sports Exerc.* 2009; 41(5): 1155-1163. doi: 10.1249/MSS.0b013e318191259c
22. Steiner AA, Dogan MD, Ivanov AI, Patel S, Rudaya AY, Jennings DH, Orchinik M, Pace TWW, O'Connor KA, Watkins LR, Romanovsky AA. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. *FASEB J.* 2004; 18(15): 1949-1951. doi: 10.1096/fj.04-2295fje
23. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 2010; 7: 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
24. Fernandes TJ, Costa J, Oliveira MBP, Mafra I. Exploiting 16S rRNA gene for the detection and quantification of fish as a potential allergenic food: A comparison of two real-time PCR approaches. *Food Chem.* 2018; 245:1034-1041. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.068
25. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Tiedje, J M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013; 42(D1), D633-D642. doi: 10.1093/nar/gkt1244
26. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods.* 2013 Oct;10(10):996–8. doi: 10.1038/nmeth.2604
27. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016 Jul;13(7):581–3. doi: 10.1038/nmeth.3869

28. TEAM, RC. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
29. Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Priesse E, Quast C, et al. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucl Acids Res.* 2014 Jan;42(D1):D643–8. doi: 10.1093/nar/gkt1209
30. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology.* 2014 Dec 5;15(12):550. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
31. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. Watson M, editor. *PLoS ONE.* 2013 Apr 22;8(4):e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
32. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O'hara R, Simpson GL, et al. *Vegan: community ecology package.* R package version 1.17-4. URL <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. 2010.
33. Flemer B, Gaci N, Borrel G, Sanderson IR, Chaudhary PP, Tottey W, O'Toole PW, Brugère J F. Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. *Gut Microbes.* 2017; 8(5): 428-439. doi: 10.1080/19490976.2017.1334033
34. Queipo-Ortuno MI, Seoane LM, Murri M, Pardo M, Gomez-Zumaquero JM, Cardona F, Casanueva F, Tinahones FJ. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS One.* 2013; 8(5): e65465- doi: 10.1371/journal.pone.0065465
35. Barton W, Penney NC, Cronin O, Garcia-Perez I, Molloy M.G, Holmes E, O'Sullivan, O. The microbiome of professional athletes differs from that of more

sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. *Gut* 2018; 67:625-633. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313627

36. Allen JM, Miller MEB, Pence BD, Whitlock K, Nehra V, Gaskins HR, White BA, Fryer JD, Woods JA. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol*. 2015; 118:8: 1059-1066. doi: 10.1152/jappphysiol.01077.2014
37. Costa RJS, Snipe RMJ, Kitic CM, Gibson PR. Systematic review: exercise-induced gastrointestinal syndrome—implications for health and intestinal disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2017; 46(3): 246-265. doi: 10.1111/apt.14157
38. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Konijeti GG, Liao X, Higuchi LM, Fuchs CS, Chan A.T. Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *Bmj*. 2013; 347: f6633. doi: 10.1136/bmj.f6633
39. Chen J, Bittinger K, Charlson ES, Hoffmann C, Lewis J, Wu G.D, Collman RG, Bushman FD, Li H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*. 2012; 28(16): 2106-2113. doi: 10.1093/bioinformatics/bts342
40. Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, Stancukas MC, Laskowski S, Dougherty J. Antonopoulos DA. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PloS One*. 2014; 9(3): e92193. doi: 10.1371/journal.pone.0092193.
41. Carvalho FA, Koren O, Goodrich JK, Johansson ME, Nalbantoglu I, Aitken JD, Clemente JC. Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut

- inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell host & microbe*. 2012; 12(2): 139-152. doi: 10.1016/j.chom.2012.07.004.
42. Wang L, Zhang K, Zhang C, Feng Y, Zhang X, Wang X, Wu G. Dynamics and stabilization of the rumen microbiome in yearling Tibetan sheep. *Sci Rep*. 2019; 9: 19620 doi: 10.1038/s41598-019-56206-3
43. Huang, WC, Wei, CC, Huang, CC, Chen, WL, Huang, HY. The beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on high-intensity, exercise-induced oxidative stress, inflammation, and performance in triathletes. *Nutrients*, v. 11, n. 2, p. 353, 2019. doi: 10.3390/nu11020353
44. Wosinska L, Cotter PD, O'Sullivan O, Guinane C. The potential impact of probiotics on the gut microbiome of athletes. *Nutrients*. 2019; 11(10): E2270. doi: 10.3390/nu1102270.
45. Reid, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and environmental microbiology* 1999; 65(9): 3763-3766. doi: 10.1128/AEM.65.9.3763-3766.1999.
46. Schaumburg F, Dieckmann R, Schmidt-Bräkling T, Becker K, Idelevich EA. First description of an *Anaerobiospirillum succiniciproducens* prosthetic joint infection. *New microbes and new infections*. 2017; 18: 1-2. doi: 10.1016/j.nmni.2017.03.001
47. Xie, Y, Zhao, P, Han, Z, Li, W, Shi, D, Xu, L, Yi, Q. (2020). Supplement of high protein-enriched diet modulates the diversity of gut microbiota in C57 or PD-1H-depleted mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2020. in press. doi: 10.4014/jmb.2008.08003

CAPÍTULO - 4 COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS E EQUINOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO INTENSO

1. Introdução

A microbiota intestinal (MI) contém trilhões de microrganismos compostos por milhares de espécies diferentes, sendo que um terço da MI é comum à maioria dos indivíduos. O restante dos microrganismos é característica individual-específica, sendo responsável pela a variação genética da MI entre indivíduos da mesma espécie (Donati Zeppa et al., 2019). Ademais esta população microbiana densa e equilibrada é constituída essencialmente por bactérias (O'Hara e Shanahan, 2006).

Em geral, a MI desempenha três papéis fundamentais no hospedeiro (Ikeda-Ohtsubo et al., 2018): (i) auxilia na digestão da fibra alimentar que, de outra forma, o hospedeiro não seria capaz de digerir e utilizar; (ii) previne a aderência de bactérias patogênicas por meio da competição por nichos ecológicos e componentes nutricionais; (iii) sintetiza alguns compostos tais como como vitaminas, neurotransmissores serotonina e dopamina, que auxiliam na manutenção da homeostase.

Em estudos científicos sobre o trato gastrintestinal (TGI), análise metagenômica do gene 16S rRNA é amplamente utilizada para obtenção abrangente e comparativa acerca da abundância relativa da MI. Assim, a análise do gene metagenômico 16S rRNA tem sido usado para estudar a MI numa significativa variedade de espécies animais (Kobayashi et al., 2020), mas poucos estudos usaram essa técnica para comparar, de forma abrangente, a abundância relativa de bactérias intestinais de diferentes espécies animais. Por exemplo, estudo recente (O' Donnell et al., 2017) utilizou o gene 16S rRNA

por meio de análise de pirosequenciamento de metagenoma para comparar MI de animais herbívoros. Recentemente, conduziram comparação entre a MI de humanos e modelos animais, como ratos, camundongos e macacos (Nagpal et al. 2018). Embora os achados deste último estudo tenham revelado que a composição da MI foi espécie-específica, o estudo não incluiu herbívoros, principalmente com ceco funcional, característica da espécie equina.

Alguns estudos verificaram o efeito de estímulos extrínsecos sobre a MI. A literatura mostra que o equilíbrio dinâmico da MI pode ser alterada por enfermidades gastrintestinais (Costa et al., 2012), modificações na dieta e exercício físico (Clarke et al., 2015; Almeida et al., 2016). O exercício é estímulo que altera transitoriamente a homeostase, tendo em vista que uma única sessão de esforço pode promover modificações reversíveis em variáveis fisiológicas. Estas mudanças podem ser diagnosticadas por meio da quantificação de variáveis laboratoriais. Dependendo do tipo de esforço, que é distinguido, tanto pela duração, frequência e intensidade do exercício, tais modificações são frequentemente detectadas por meio da dinâmica de variáveis fisiológicas (Ferraz et al., 2010; Restan et al., 2020). Exemplificando, num teste de esforço na esteira, caracterizado pelo aumento progressivo da intensidade de esforço, é comum observar aumento da taxa glicolítica e hidrólise do ATP, durante a contração da fibra muscular esquelética, com indução de acidose metabólica (Robergs et al., 2001).

Alguns estudos recentes que empregaram técnicas de sequenciamento genético relataram que o exercício pode alterar a MI em animais de laboratório. Tal fato modifica a estrutura e a diversidade da MI de camundongos (Allen et al., 2015). Outro estudo

identificou que a variação de esforço físico produziu alterações na microbiota cecal de camundongos normais e diabéticos (Lambert et al., 2015). No presente estudo, objetivamos acumular conhecimento a respeito da singularidade ou semelhança da abundância relativa (AR%) de bactérias da MI entre espécies de animais monogástricos com hábito alimentar distinto e submetidos ao exercício intenso.

2. Material e métodos

2.1 Animais

Equinos

Doze equinos da raça Mangalarga Marchador (MM), com 3 anos de idade, peso corporal médio de 330 ± 30 kg e em estágio incipiente de condicionamento físico foram submetidas a um período de adaptação que durou 34 dias. Esse período consistiu na realização de doma e cabrestamento; ambientação ao manejo, dieta, instalações e aos equipamentos de exercício: esteira (Gallopers Sahinco®) e caminhador automático (Sahinco®). Nos primeiros cinco dias realizou-se desverminação (Equimax® - Virbac Saúde Animal), casqueamento e avaliação e tratamento odontológico. Nenhum animal recebeu antibiótico ou anti-inflamatório e não foi relatado doença gastrointestinal no período anterior há 6 meses. Todas as potras do experimento ficaram alojadas em piquete com pasto sendo deslocadas para a sala da esteira ou caminhador somente na hora da sessão de treino. Os animais foram alimentados com concentrado em baias individuais.

Ratos

Utilizaram-se 100 ratos da linhagem Wistar, machos, jovens, pesando entre 150 e 250g, procedentes do Biotério Central da UNESP – Botucatu e mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UNESP - Jaboticabal. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas com cama de maravalha em um ambiente com ciclo de claro:escuro invertido (18h-6h luzes ligadas) e temperatura controlada (22°C), com água e ração para roedores (Agromix Nutrição Animal - Jaboticabal/SP- Brasil) ad libitum. Todos os protocolos experimentais utilizando animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal.

a. Teste de esforço

Equinos

O protocolo do teste consistiu em 10 min de aquecimento (5 min a $1,7 \text{ m s}^{-1}$ e 5 min a $3,5 \text{ m s}^{-1}$, sem inclinação da esteira) (Almeida et al., 2016). Após o aquecimento, a esteira foi elevada à inclinação de 3% na velocidade de 4 m s^{-1} e iniciou-se a fase de velocidade progressiva em que a velocidade foi aumentada em 1 m s^{-1} a cada três minutos. O teste foi mantido até que os animais atingissem à fadiga, que foi identificada pela incapacidade das potras de acompanhar a velocidade da esteira mesmo sob estímulos para continuar. O desaquecimento teve duração de 10 minutos (5 min a $3,5 \text{ m s}^{-1}$ e 5 min a $1,7 \text{ m s}^{-1}$). Por meio de sistema de cateter (BD Insyte™ 14 G) e tubo extensor (60 cm – Embramed®) inserido na veia jugular externa, coletaram-se amostras

sanguíneas nos 30 segundos finais de cada etapa. Os dados da concentração de lactato plasmático vs as etapas de velocidade estabeleceram o limiar de lactato.

Ratos

Os testes de esforço iniciaram sempre numa velocidade de 12 m min^{-1} , a qual foi aumentada 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 para 2 m min^{-1} a cada 3 min²³. Este acréscimo foi mantido até que os ratos atingissem a exaustão, caracterizada quando tocassem a porção traseira da esteira cinco vezes no período de 1 min.

2.3 Extração do DNA e sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA pelo Illumina

Conteúdo fecal de equinos

O DNA foi extraído a partir das amostras fecais por meio da utilização do kit FastDNA SPIN for soil (Mpbio®). A quantificação e a qualidade do DNA foram avaliadas por meio de espectrofotometria (NanoDrop®, Thermo Fisher Scientific). As concentrações finais de DNA foram diluídas para 20ng/uL. A região V4 do gene 16SrRNA foi amplificada numa reação contendo: 25µL de Kapa 2G Fast Hot Start Ready Mix 2X (Kapa Biosystems, USA), 1,3µL de Mg Cl₂ (50mM) (Invitrogen, USA), 1,0µL de BSA (2 mg/ml) (Bio-Rad), 16,7µL água livre de nucleasse, 2µL de DNA e 2µL dos oligonucleotídeos iniciadores (10 pMol/µL): primer forward (S-D-Bact-00564-a-S-15 (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3')) e primer reverse (S-D-Bact-0785-b-A-18 (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3')). Os oligonucleotídeos utilizados na reação de

amplificação foram desenhados contendo os adaptadores (forward TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG e reverse GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG) e o index de 8pb (forward AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-index-TCGTCGGCAGCGTC e reverse CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTCTCGTGGGCTCGG) da Illumina para que as amostras pudessem ser aneladas na lâmina de sequenciamento, visto que os oligonucleotídeos iniciadores são complementares aos da lâmina de sequenciamento.

As amostras foram amplificadas no termociclador Mastercycler pro S (Eppendorf, Hamberg, Germany) sob as seguintes condições: 3min à 94°C para a desnaturação inicial, seguido de 25 ciclos de 45seg à 94°C para desnaturação, 1 min à 50°C para anelamento e 90 seg à 72°C para extensão, seguido de 10 min à 72°C para extensão final da fita e foram mantidas a 4°C. Como controle positivo utilizou-se o DNA genômico de uma mistura bacteriana e água livre de nuclease foi utilizada como controle negativo.

Ao final da amplificação as bibliotecas de amplicons foram purificadas com microesferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc, Mississauga, ON), com pequena modificação no protocolo do fabricante. Foram adicionados 72uL da solução com microesferas magnéticas em 20uL das bibliotecas amplificadas, esta mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. Logo após, as amostras foram lavadas duas vezes com etanol 80%, e ao final foram eluídas em 40uL de água livre de nucleasse. As amostras purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) e qualificadas em gel de agarose 1%, após este procedimento as amostras foram diluídas a 5ng/uL. O sequenciamento foi realizado na

University of Guelph's Advanced Analysis Centre, utilizando-se plataforma Illumina MiSeq (Illumina RTA v1.17.28; MCS v2.2) com o kit 2 x 250pb.

Conteúdo cecal de ratos

O DNA microbiano foi extraído por meio da utilização do kit FastDNA SPIN for soil (Mpbio®). A quantificação e a qualidade do DNA foram determinadas por meio de espectrofotometria (NanoDrop®, Thermo Fisher Scientific). Por conseguinte, a integridade do material genético foi definida em gel de agarose 1%, sendo uma alíquota de 5µL da solução de DNA metagenômico, com 3µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol [p:v] e 50% de glicerol [v:v]) submetida à eletroforese horizontal com tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) corado por *sybr gold* (0,5 µg/mL) (Invitrogen®), em torno de 2 h, numa voltagem constante de 80 V. As concentrações finais de DNA foram diluídas para 20 ng/µL. A qualidade do material genético extraído foi avaliada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo 800 Scientific) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, sendo a relação 260/280 utilizada para estimar a pureza do DNA. E a concentração de DNA desse material foi feita no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com o kit Qubit™ DNA BR Assay Kit (Invitrogen®), seguindo-se as recomendações do fabricante. A amplificação das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA foi realizada após o processo de extração, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) a 95°C por três minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 90 segundos e 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por cinco minutos, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGCCTAA-3') e 926R (5'-

GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). As reações de PCR e a integridade dos fragmentos amplificados foram feitas de acordo com Fernandes et al. (2018)³⁹.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery w/ Zymo-Spin™ IC Columns (Zymo Research, Irvine, CA) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação das amostras/bibliotecas utilizando o KAPA Library Quantification Kit Illumina® por PCR quantitativa seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas purificadas e quantificadas foram misturadas de maneira equimolar e sequenciadas (2x250pb) com o MiSeq® Reagent Kit v2 (500 ciclos) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando-se a plataforma Illumina. As sequências foram analisadas utilizando o programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) versão 1.9.1³⁸, sendo que sequências com tamanho menor que 150-200pb e quimeras detectadas foram eliminadas. Para alinhamento das sequências de alta qualidade e, consequentemente, obtenção da designação taxonômica e a abundância relativa dos diferentes grupos bacterianos, utilizou-se *Ribosomal Database Project* (RDP-II)⁴⁰ como banco de dados. Os alinhamentos resultantes foram utilizados na construção da matriz de distância e para agrupar as sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs).

2.4 Bioinformática

Equinos

A análise bioinformática foi realizada utilizando-se o software Mothur (versão 1.31.2) seguindo protocolo de um estudo previamente publicado (Kozich et al., 2013). As

sequências de boa qualidade foram classificadas em “operational taxonomic units” (OTUs) e agrupadas a 97% de similaridade e subsequentemente alinhadas com a base de referência (Quast et al., 2012). A classificação taxonômica de cada OTU foi feita com a base de dados Ribosomal Database Project (RDP, março de 2012) (Cole et al., 2013). A detecção de quimeras foi realizada utilizando-se o software uchime (Edgar et al., 2011). Para diminuir os erros de sequências não uniformes, foi utilizada uma subamostragem (16.656 sequencias por amostra). Para garantir a representação da subamostragem foi calculada a Good’s coverage e a avaliação visual da cobertura do número de espécies presentes em cada amostra foi feita por meio das curvas de rarefação.

Ratos

Os conjuntos de dados avaliados quanto à qualidade utilizando FastQC e fastx_info do conjunto de ferramentas do pacote USEARCH (v11.0.667) (Edgar, 2013). Os primers foram removidos das sequências utilizando a ferramenta fastx_truncate e os parâmetros de distribuição do tamanho das sequências e o erro esperado das leituras por biblioteca foram obtidos por meio da ferramenta fastq_eestats2 ambos pertencentes ao pacote de ferramentas do USEARCH (v11.0.667) (Edgar, 2013). Para análise do microbioma cecal dos ratos, utilizamos o pipeline *Devisive Amplicon Denoising Algorithm* - dada2 (v1.14.1) (disponível em <https://github.com/benjjneb/dada2>) (Callahan et al., 2016) para inferir e quantificar ASVs (Amplicon Sequence Variants) no R (v3.6.3). As leituras brutas foram truncadas nas posições de 220 pb (forward) e 210 pb (reverse); usando a função filterAndTrim com parâmetros padrão (maxN = 0, truncQ = 2 e maxEE

= 2), leituras inferiores ao parâmetro de truncagem foram descartadas. A taxa de erro por amostra foi estimada baseado no modelo de erro realizado pela função `learnErrors` em seguida as reads foram dereplicadas. Por fim as sequências *forward* e *reverse* foram fundidas com sobreposição em 12 bases e sequências quimericas foram removidas. A atribuição taxômica dos ASVs montados foram realizados pelo classificador Naive Bayesian (implementado no DADA2) usando o conjunto de treinamento do banco de dados SILVA versão 132. As ASVs que apresentavam abundância menor que 4 reads e que não estavam presentes em pelo menos 15% das amostras foram descartadas das análises e os dados foram normalizados usando o pacote DESeq2 (v1.26.0). Para manipulação geral dos dados e análises estatística, utilizamos os pacotes Phyloseq (v1.30.0) e Vegan (v2.5.6) no R. A análise de espécie indicadora foi realizada pelo pacote labdsv (v2.0.1) por meio da função *indval*.

3. Resultados

3.1 Abundância relativa (AR%)

Para os equinos avaliados no presente estudo, o número de OTUs na sub-amostragem da população variou entre 1290 a 2296 (média: 1842 ± 256). Os filos com abundância relativa acima de 1% podem ser observados na **Fig. 1A**. As sequencias obtidas foram classificadas num total de 7 filos, sendo que os mais abundantes foram *Firmicutes* (50,3%), *Verrucomicrobia* (14,2%), seguido por 12,2% de bactérias que não foram classificadas no nível de filo (*unclassified*). Para os 7 filos foram atribuídos 165

gêneros, mas somente 14 apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Os três gêneros mais abundantes foram o *Clostridiales* não classificados (*unclassified*) ao nível do gênero (16,7%) seguidos por “5 *genus incertae sedis*” (12,4%) e bactérias não classificadas ao nível do filo (12,8%) (**Fig. 2A**).

Com relação aos ratos foi possível a identificação de 10 diferentes filos bacterianos (**Fig. 1B**). A maior AR% foi do filo *Proteobacteria* (39%), seguido pelos filos *Bacteroidetes* (26,3%) e *Firmicutes* (25,5%). Encontraram-se 44 gêneros (**Fig. 2B**), sendo o mais abundante o gênero *Anaerobiospirillum* (49%) seguidos por *Ruminococcaceae_UCG-014* (8,7%) e *Lactobacillus* (5,3%).

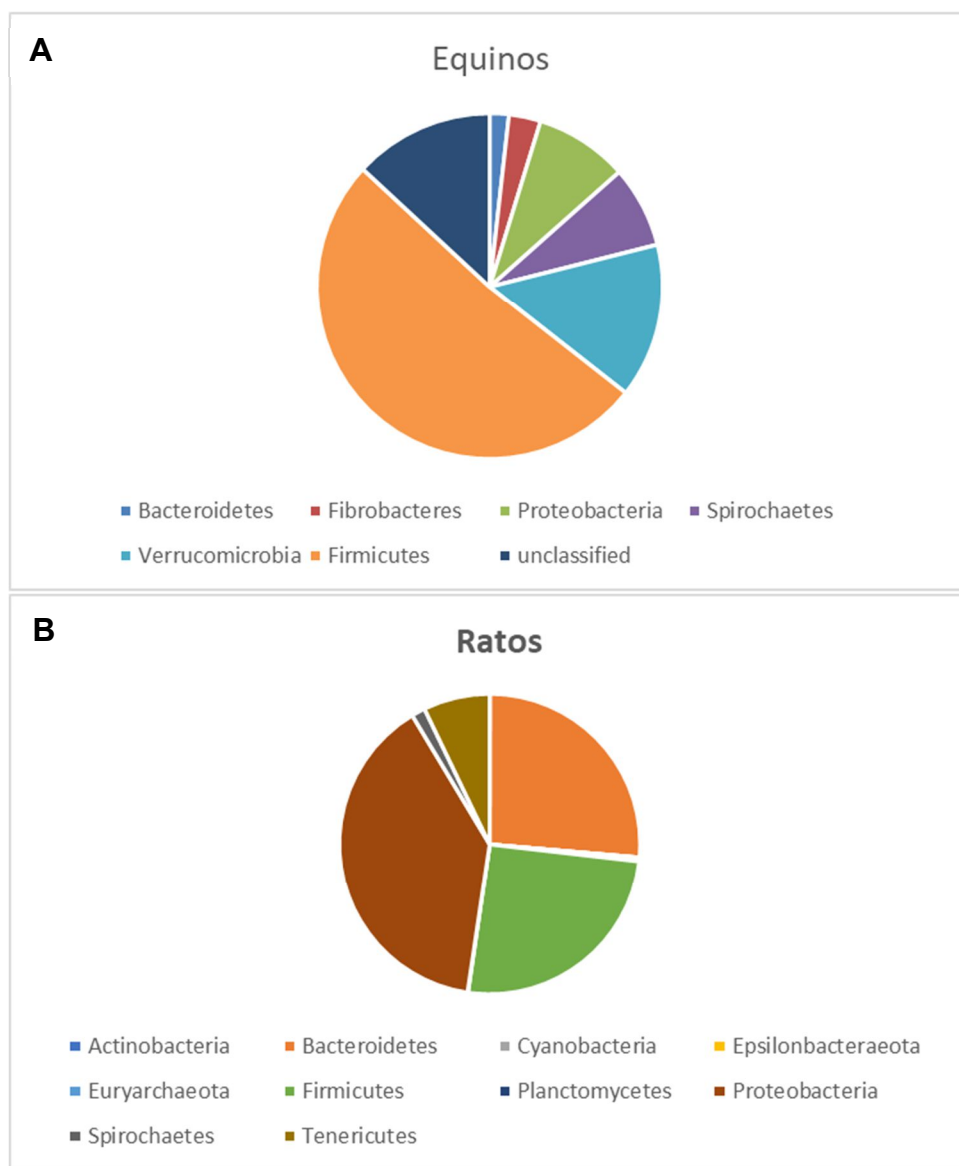


Figura 1. Principais filos que apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Em A, microbiota fecal de equinos. Em B, microbiota cecal de ratos.

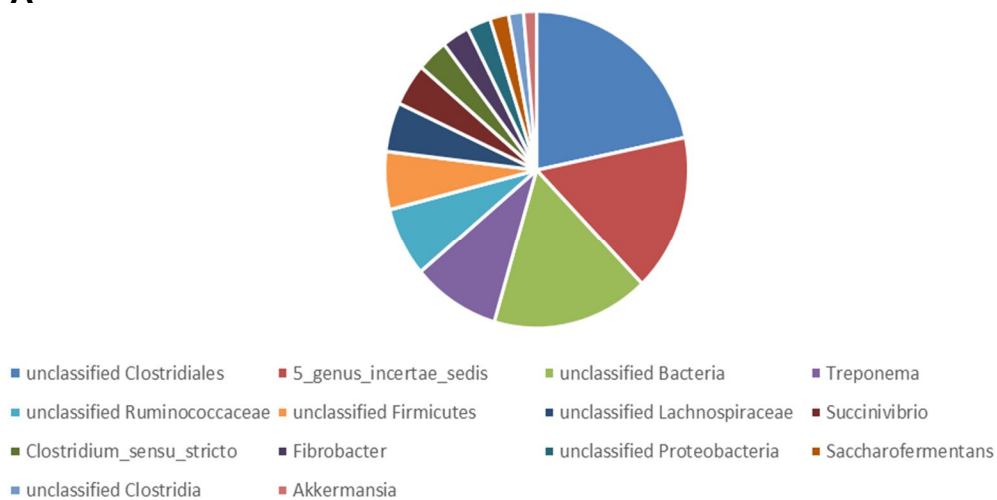
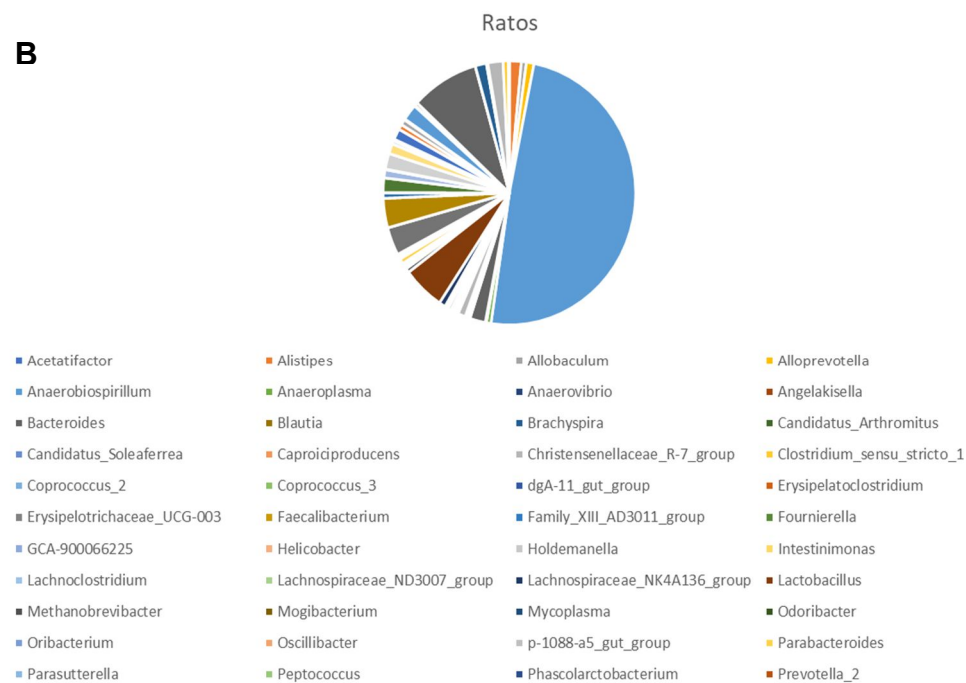
A**B**

Figura 2. Principais gêneros que apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Em A, microbiota fecal de equinos. Em B, microbiota cecal de ratos.

4. Discussão

Embora todas as espécies animais tenham uma população microbiana no intestino, que desempenha papéis essenciais na fisiologia do hospedeiro, foi sugerido que variações das comunidades microbianas na MI depende dos *habitats*, comportamentos alimentares e da estrutura anatômica e fisiologia do TGI dos animais (Ikeda-ohtsubo et al., 2018). Provavelmente, este conceito é um tanto tendencioso, ainda que no passado, os estudos tenham utilizado variedade marcante de métodos analíticos, as informações obtidas surgiram principalmente de vários estudos com foco na MI de única espécie animal (Chassaing et al., 2015; Chung et al., 2016; Costa et al., 2015; Shigeno et al., 2018). Para obtenção de uma visão abrangente das semelhanças ou dissimilaridades entre a MI fecal de diferentes espécies animais, no presente estudo, nós comparamos a população microbiana em amostras fecais, no caso dos equinos e cecais de ratos duas espécies monogástricas, usando protocolos analíticos relativamente distintos.

Deve-se ressaltar que na presente pesquisa, as duas espécies animais foram criadas em instalações diferentes e alimentados com dietas diferentes. Assim, em última análise, esta poderia ser limitação deste estudo, a falta de normalização e controle dos ambientes de criação. Tendo em vista as limitações supramencionadas acreditamos que valeu a pena comparar as MIs estudadas no presente trabalho, embora os locais de criação e as dietas não estivessem sob controle.

A análise taxonômica revelou que, no nível filo, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* estavam comumente presentes em alta abundância nas fezes. Por outro lado, no nível de gênero, as duas espécies, ratos ou equinos, apresentaram composição característica das respectivas MI.

Para estudos futuros, pode ser recomendado a padronização ambientais e de dietas para obtenção de informações mais precisas sobre a especificidade de espécies bacterianas da MI. Finalmente, semelhanças nos perfis microbianos de equinos e ratos podem ser interessantes para indústria produtora de ração.

5. Conclusão

A presente pesquisa caracterizou e comparou da MI de equinos e ratos, sendo que os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* estão presentes em abundância nas duas espécies animais submetidas a exercício intenso.

6. Referências

ALMEIDA, M.L.M.; FERINGER, W.H.; CARVALHO, J.R.G.; RODRIGUES, I.M.; JORDAO, L.R.; FONSECA, M. G.; LEMOS, E.G.D.M.; WEESE, J.S.; COSTA, M.C.; FERRAZ, G.C. Intense exercise and aerobic conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. **PLoS one**, v. 11, n. 12, p. e0167108, 2016.

ALLEN, J.M.; MILLER, M.E.B.; PENCE, B.D.; WHITLOCK, K.; NEHRA, V.; GASKINS, H. R.; WOODS, J.A. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. **Journal of Applied Physiology**, 2015.

CALLAHAN, B.J.; MCMURDIE, P.J.; ROSEN, M.J.; HAN, A.W.; JOHNSON, A.J.A.; HOLMES, S.P. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.

CHASSAING B., KOREN O., GOODRICH J.K., POOLE A.C., SRINIVASAN S., LEY RE, GEWIRTZ A.T. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, n. 7541, p. 92-96, 2015.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

CHUNG W.S.F., WALKER A.W., LOUIS P., PARKHILL J., VERMEIREN J., BOSSCHER D., FLINT H.J. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. **BMC biology**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2016.

CLARKE S.F., MURPHY E.F., O'SULLIVAN LUCEY, A.J., HUMPHREYS M., HOGAN A., COTTER P.D. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. **Gut**. 2014 gutjnl-2013.

COSTA M.C., ARROYO L.G., ALLEN-VERCOE E., STAMPFLI H.R., KIM P.T., STURGEON A., WEESE J.S. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. **PLoS one**. 2012;7: e41484.

COSTA, M.C. STÄMPFLI H.R., ARROYO L.G., ALLEN-VERCOE E., GOMES R.G., WEESE, J.S. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 19, 2015.

DONATI ZEPPA S., AGOSTINI D., GERVASI M., ANNIBALINI G., AMATORI S., FERRINI F., STOCCHI V. Mutual Interactions among Exercise, Sport Supplements and Microbiota. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 17, 2020.

EDGAR, R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 996-998, 2013.

FERRAZ, G. C.; SOARES, O. A. B., FOZ, N. S. B., PEREIRA, M. C., QUEIROZ-NETO, A. The workload and plasma ion concentration in a training match session of high-goal (elite) polo ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 191-195, 2010.

IKEDA-OHTSUBO W.; BRUGMAN S.; WARDEN C.H.; REBEL J.M.; FOLKERTS G.; PIETERSE, C.M. How can we define “optimal microbiota?”: A comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, p. 90, 2018.

KOBAYASHI, R. NAGAOKA, K., NISHIMURA, N., KOIKE, S., TAKAHASHI, E., NIIMI, K., INOUE, R. Comparison of the fecal microbiota of two monogastric herbivorous and five omnivorous mammals. **Animal Science Journal**, v. 91, n. 1, p. e13366, 2020.

KOZICH, J.J.; WESTCOTT, S.L.; BAXTER, N.T.; HIGHLANDER, S. K.; SCHLOSS, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112-5120, 2013.

LAMBERT, J.E.; Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 40, n. 7, p. 749-752, 2015.

NAGPAL, R.; WANG, S.; SOLBERG WOODS, L.C.; SESHIE, O.; CHUNG, S.T.; SHIVELY, C.A.; YADAV, H. Comparative microbiome signatures and short-chain fatty acids in mouse, rat, non-human primate, and human feces. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2897, 2018.

O'DONNELL, M.; HARRIS, H.M.; ROSS, R.P.; O'TOOLE, P.W. Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. **Microbiologyopen**, v. 6, n. 5, p. e00509, 2017.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

RESTAN, A.Z.; CAMACHO, A.A.; CERQUEIRA, J.A., ZACCHÉ, E.; KIRNEW, M.D.; LOUREIRO, B.A.; FERRAZ, G.C. Effect of a lactate-guided conditioning program on heart rate variability obtained using 24-Holter electrocardiography in Beagle dogs. **Plos one**, v. 15, n. 6, p. e0233264, 2020.

ROBERGS, RA. Exercise-induced metabolic acidosis: where do the protons come from. **Sportscience**. 2001;5: 1-20.

SHIGENO Y.; TOYAMA M.; NAKAMURA M.; NIIMI K.; TAKAHASHI E.; BENNO, Y; Comparison of gut microbiota composition between laboratory-bred armoises (*Callithrix jacchus*) with chronic diarrhea and healthy animals using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Microbiology and Immunology**, v. 62, n. 11, p. 702-710, 2018.