

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

**TREINAMENTO E "OVERTRAINING" INDUZIRAM
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM
RATOS WISTAR**

Henriette Gellert Moranza
Bióloga

2017

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

**TREINAMENTO E "OVERTRAINING" INDUZIRAM
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM
RATOS WISTAR**

Henriette Gellert Moranza

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

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

2017

M829t Moranza, Henriette Gellert
Treinamento e "overtraining" induziram alterações
comportamentais e bioquímicas em ratos Wistar / Henriette Gellert
Moranza. – – Jaboticabal, 2017
vi, 72 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz
Banca examinadora: Herbert Gustavo Simões, Luciane Helena
Gargaglione Batalhão
Bibliografia

1. Alterações comportamentais. 2. Campo aberto. 3.
Corticosterona. 4. Esteira. 5. Exercício físico. 6. Labirinto em cruz
elevado. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 599.323:612.76



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TREINAMENTO E "OVERTRAINING" INDUZIRAM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM RATOS WISTAR

AUTORA: HENRIETTE GELLERT MORANZA

ORIENTADOR: GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

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

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

Prof. Dr. HERBERT GUSTAVO SIMÕES
Departamento de Educação Física / Universidade Católica de Brasília

Profa. Dra. LUCIANE HELENA GARGAGLIONI BATALHÃO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 22 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Henriette Gellert Moranza, Campinas, 13/09/1990 – nascida em Campinas, São Paulo, em 13 de setembro de 1990, filha de Paulo Célio Moranza e Lillian Gellert Moranza. Realizou sua graduação em Ciências Biológicas, modalidade Bacharel na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP). Concluiu seus estudos e obteve o título de Bacharela em Ciências Biológicas em fevereiro de 2014. Realizou estágio na Embrapa meio ambiente - Jaguariúna, SP - sendo bolsista de Iniciação Científica do CNPq durante os anos 2011 e 2012 sob orientação do Mestre Laerte Scanavacca Júnior. Durante o período de 2011 à 2014, em conjunto com a EMBRAPA (2011 à 2012) realizou estágio no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício (LAFEQ) sob orientação do Prof.Dr.Guilherme de Camargo Ferraz. Neste período desenvolveu projetos relacionados a plantas medicinais, fitoterápicos, fisiologia do exercício e comportamento animal em ratos Wistar. Em março de 2015, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FCAV/UNESP/JABOTICABAL, na área de Metabolismo Animal como bolsista do CNPQ e sob orientação do Prof.Dr.Guilherme de Camargo Ferraz.

“A tarefa difícil não é ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

DEDICO

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

À minha irmã **Raissa Gellert Moranza** por estar sempre ao meu lado e por ser essa pessoa maravilhosa em que eu me espelho.

Ao meu irmão **Paulo Moranza Jr** pelo pelo carinho e por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

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

Ao **Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz**, por toda orientação, pelos ensinamentos, amizade e por me ajudar sempre a subir cada degrau desta caminhada com paciência e sabedoria;

À banca examinadora da defesa da dissertação, **Profa. Dra. Luciane Helena G. Batalhão** e **Prof. Dr. Herbert Gustavo Simões** pela disponibilidade e contribuições.

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

À **Malú**, pela amizade, companheirismo, apoio, carinho, por estar do meu lado nesta caminhada que não foi fácil, me ajudando a subir cada degrau, por ser esta amiga tão especial.

Ao meu amigo **Walter**, pela amizade, auxílio e por toda a ajuda e paciência nessa etapa.

A **Maria Isabel Mataqueiro**, pela amizade e por todos os ensinamentos.

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

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

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

À equipe do Laboratório de Bioquímica do Exercício - LABEX - da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em especial a **Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo** pela orientação fornecida para realização deste estudo.

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

Ao programa de Zootecnia e ao CNPQ pela Bolsa de Mestrado concedida para o desenvolvimento desta dissertação.

SUMÁRIO

Página

CEUA	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1.OBJETIVO GERAL.....	3
1.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.3.REVISÃO DE LITERATURA	5
1.3.1."Nonfunctional overreaching" e Síndrome do "overtraining"	5
1.3.2.NFOR/SOT, eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e cortisol.....	9
1.3.3.NFOR/SOT e aspectos comportamentais	12
1.3.4.NFOR/SOT e lactato	14
1.3.5.REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2 - Treinamento e "overtraining" induziram alterações comportamentais e bioquímicas em ratos Wistar	24
2. INTRODUÇÃO	24
2.1.MÉTODOS	27
2.1.1.Animais.....	27
2.1.2.Protocolo de "overtraining" (PO).....	27
2.1.3.Testes de desempenho.	29
2.1.4.Quantificação do desempenho (D)	30

2.1.5. Grupos experimentais.	30
2.1.6. Avaliação do período de recuperação.	31
2.1.7. Testes comportamentais	32
2.1.8. Corticosterona.	33
2.1.9. Lactato e glicose.....	33
2.1.10. Peso relativo das glândulas adrenais	34
2.1.11. Análise estatística.....	34
2.2. RESULTADOS	34
2.2.1. Desempenho dos grupos nos testes 1 a 9	34
2.2.2. Peso corpóreo	36
2.2.3. Consumo de ração e ingestão de água no período de recuperação	38
2.2.4. Efeitos do PO sobre o comportamento.....	38
2.2.5. Corticosterona	40
2.2.6. Lactato e glicose.....	41
2.2.7. Peso relativo das adrenais.	44
2.3. DISCUSSÃO	45
2.4. CONCLUSÕES	50
2.5. IMPLICAÇÕES FUTURAS	50
2.6. REFERÊNCIAS	51
3. APÊNDICE.....	56

CEUA



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



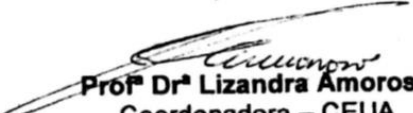
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 05 de janeiro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

TREINAMENTO E "OVERTRAINING" INDUZIRAM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM RATOS WISTAR

RESUMO

Objetivo: investigar o comportamento, concentrações de corticosterona, lactato e glicose de ratos Wistar submetidos a um protocolo de "overtraining" (PO) para o desenvolvimento de "Functional" (FOR) ou "Nonfunctional Overreaching" (NFOR). **Métodos:** inicialmente a amostragem de indivíduos foi de 49. O grupo controle (C, n= 16) realizou um programa de condicionamento leve (1 sessão/dia/ 2x/sem./12 m.min⁻¹). Os outros ratos (n= 33) foram submetidos ao PO, com duração de 12 sem., prescrito para produzir um desequilíbrio entre as sessões de exercício e o 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 física, os ratos foram submetidos a sete testes de esforço máximo (T-máx) durante e dois testes após o PO. Dois grupos foram identificados pela diferença da inclinação (α) obtida a partir da regressão linear dos desempenhos individuais nos Tmáx-3, 4, 5, 6 e 7. Ratos NFOR (n= 14) tiveram $\alpha = < -0.98$. Analisou-se a recuperação passiva de 2 sem., sendo realizado testes de Campo Aberto (CA) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Neste período, dois Tmáxs (8 e 9) foram realizados para verificação da continuidade das condições FOR e NFOR. Em Tmáx-2, Tmáx-6 e Tmáx-9 realizaram-se coletas sanguíneas para quantificação das concentrações plasmáticas de lactato ([lac]_{antes} e [lac]_{após}) e glicose ([glic]_{antes} e [glic]_{após}). Quantificou-se corticosterona durante o repouso e após os Tmáx-7 e 9, ([cort]_{repouso} e [cort]_{após}). Glândulas adrenais foram coletadas e pesadas. Para análise estatística aplicaram-se ANOVA de uma via e para medidas repetidas no tempo, testes t de Student pareado e não pareado e foi realizada correlação de Pearson (P< 0.05). **Resultados:** FOR e NFOR tiveram aumento de desempenho a partir do Tmáx-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 Tmáx-7 (292.2±36.4 kg.m). No teste CA, ocorreu aumento da frequência de levantar para os grupos FOR e NFOR em relação ao grupo C. Houve redução da [lac]_{após} para FOR e NFOR no Tmáx-6 em relação ao grupo C (3.61±0.38; 5.43±0.63; 7.64±0.43 mmol/L, respectivamente) sendo que NFOR obteve lactatemia maior que FOR. Ainda no Tmáx-6, a [glic]_{após} foi menor em FOR em relação ao grupo C (5.66±0.17 vs. 6.52±0.21). Não houve diferença para as concentrações de corticosterona. Houve aumento do índice adrenosomático para o grupo NFOR no Tmáx-7 e redução deste após o Tmáx-9. **Conclusões:** "functional" ou "nonfunctional overreaching" provocou ansiedade e alterações nas concentrações de lactato e glicose em ambos os grupos bem como aumento do índice adrenosomático nos ratos que demonstraram a condição NFOR.

Palavras chave: alterações comportamentais, campo aberto, corticosterona, esteira, exercício físico, labirinto em cruz elevado

TRAINING AND OVERTRAINING INDUCED BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN WISTAR RATS

ABSTRACT

Purpose: To investigate the behavior, corticosterone and lactate concentrations of Wistar rats submitted to an overtraining protocol (OP) for the development of functional (FOR) or nonfunctional overreaching (NFOR). **Methods:** Sampling of rats was 49. The control group (C, $n = 16$) performed a mild conditioning program (1 session/day / 2x/wk/12 m.min⁻¹). The other rats, $n = 33$, were submitted to 12-week OP prescribed to produce an imbalance between the exercise sessions and the recovery period. In 8 wks. daily training sessions were performed for 5 consecutive d followed by 2 d of recovery. In the following 4 wks. (2, 3, 4 and 4 x / d) there was an increase in training frequency and reduction of recovery time between sessions (4, 3, 2 and 2 h). To evaluate physical fitness, the rats were submitted to seven maximum tests (Tmax) during and two tests after the PO. Two groups were identified by the slope difference (α) obtained from the linear regression of individual performances at Tmax-3, 4, 5, 6 and 7. NFOR rats ($n = 14$) had $\alpha = -0.98$. Passive recovery of 2 wks was analyzed, and Open Field (OF) and Elevated Plus Maze (EPM) tests were performed. In this period, 2 Tmaxs (8 and 9) were performed to verify the continuity of FOR and NFOR conditions. Blood samples were collected for Tmax-2, Tmax-6 and Tmax-9 for the quantification of plasma lactate concentrations ($[lac]_{before}$ and $[lac]_{after}$) and glucose ($[glic]_{before}$ and $[glic]_{after}$). Corticosterone was measured at rest and after Tmax-7 and 9, ($[cort]_{rest}$ and $[cort]_{after}$). Adrenal glands were collected and weighed. For statistical analysis one-way ANOVA and repeated measures ANOVA, paired and unpaired Student's t-tests and a Pearson correlation were performed ($P < 0.05$). **Results:** NFOR and FOR had an increase in performance from Tmax-2 (303.8 ± 13.8 , 294.3 ± 18.9 and 190.2 ± 12.2 kg.m, respectively). The NFOR group had reduced performance in Tmax-7 (292.2 ± 36.4 kg.m). In the OF test, there was an increase in the frequency of rearing for the FOR and NFOR groups in relation to the C group. There was reduction of $[lac]_{after}$ for FOR and NFOR in Tmax-6 compared to group C (3.61 ± 0.38 , 5.43 ± 0.63 , 7.64 ± 0.43 mmol/L, respectively) and NFOR obtained lactate concentrations greater than FOR. Still in Tmax-6, $[glic]_{after}$ was lower in FOR compared to group C (5.66 ± 0.17 vs. 6.52 ± 0.21). In Tmax-7, resting was lower for the NFOR group compared to C. There was no difference in corticosterone concentrations. There was an increase in the adenosomatic index for the NFOR group in the Tmax-7 and a reduction in the latter after the Tmax-9. **Conclusion:** functional and nonfunctional overreaching caused anxiety and changes in lactate and glucose concentrations in both groups as well as increase in the adenosomatic index in rats that demonstrated the NFOR condition.

Keywords: behavior alterations, open field, corticosterone, treadmill, physical exercise, plus maze

LISTA DE ABREVIATURAS

OT - "overtraining"

SOT - síndrome de "overtraining"

FOR - "overreaching" funcional

NFOR - "overreaching" não funcional

HHA - eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

LCE - labirinto em cruz elevado

CA - campo aberto

C - grupo controle

PO - Protocolo de "overtraining"

F1 - fase 1

F2 - fase 2

F3 - fase 3

F4 - fase 4

F5 - fase 5

Tmáx - teste de esforço máximo

[lac]_{antes} - lactato antes do Tmáx

[lac]_{após} - lactato após Tmáx

[glic]_{antes} - glicose antes do Tmáx

[glic]_{após} - glicose após Tmáx

[cort]_{repouso} - concentração corticosterona antes do início do PO e antes dos Tmáx-7 e 9

[cort]_{após} - concentração corticosterona após Tmáx-7 e Tmáx-9

RP1 - semana de recuperação passiva 1

RP2 - semana de recuperação passiva 2

CA - teste de campo aberto

LCE - teste de labirinto em cruz elevado

POMS - Questionários de perfil de estado de humor ("Profile of Mood States")

i.p - via intraperitoneal

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A incidência da síndrome do "overtraining" (SOT) está relacionada com a redução da aptidão física nos atletas de alto rendimento. Numa temporada de treinamento periodizado ocorre prescrição de intensidades progressivas com o propósito de produzir alterações fisiológicas e comportamentais benéficas para aumentar a capacidade física dos atletas (MEEUSEN et al., 2013). Neste processo, atletas podem ser submetidos à vários ciclos dentro de um período competitivo, com momentos de inaptações, notadamente nas fases de intensificação do treino, que são costumeiramente utilizadas na tentativa de se incrementar a aptidão física. Neste momento, quando o tempo de recuperação não é respeitado, a resposta estressante gerada, a partir do treinamento desequilibrado, pode trazer reações negativas, provocando uma inaptação psicossomática com possíveis repercussões indesejáveis no rendimento atlético, podendo desencadear a SOT (DE FREITAS; MIRANDA; BARRA FILHO, 2009).

Tendo em vista o conflito de nomenclatura existente na literatura sobre a SOT, nesta dissertação seguimos o posicionamento do Colégio Europeu de Ciências do Esporte e do Colégio Americano de Ciências do Esporte (MEEUSEN et al., 2013), que caracterizou o "overtraining" (OT) como um processo contínuo de treinamento progressivo e intenso com possível indução das condições "functional overreaching" (FOR), "nonfunctional overreaching" (NFOR) ou síndrome de "overtraining" (SOT).

A condição FOR é caracterizada pela intensificação das sessões do treino, que provoca redução momentânea da aptidão física, sendo revertida pela prescrição de períodos adequados de recuperação (AUBRY et al., 2015). Isto provoca o efeito conhecido como "supercompensação" que promove condicionamento (GANDRA et al., 2012). Sabendo que o treinamento desportivo visa principalmente a maximização do desempenho promovida por adaptações bioquímicas, musculares, neurológicas e

comportamentais (MEEUSEN et al., 2013; ROHLFS et al., 2005), a FOR é considerada no meio esportivo uma estratégia para ganho posterior de aptidão física (MEEUSEN et al., 2013).

Já a NFOR ocorre quando se intensifica as intensidades de esforço, sem a devida atenção ao ciclo sessão de treino-recuperação, acarretando numa redução persistente ou estagnação da aptidão física, com tempo de reversão desta condição podendo durar semanas ou meses. Esta condição apresenta sintomas como fadiga crônica e alterações maléficas endócrinas, bioquímicas, imunológicas, fisiológicas e comportamentais (AUBRY et al., 2015; MEEUSEN et al., 2013). A NFOR ao longo do tempo pode desencadear a SOT, que possui etiologia multifatorial sendo caracterizada pela recuperação ainda mais prolongada. Esta síndrome é considerada uma importante resposta do organismo dos atletas de alto rendimento sendo relacionada à diminuição do desempenho, tanto em humanos quanto em equinos (MCGOWAN; WHITWORTH, 2008).

Além da redução no desempenho, outras alterações fisiológicas e comportamentais são descritas na NFOR/SOT, como depressão, ansiedade, irritabilidade, distúrbios do sono, falta de motivação, perda de apetite e peso corpóreo, alterações na frequência cardíaca e pressão arterial, susceptibilidade à infecções e diminuição das concentrações de lactato em testes máximos e submáximos (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). No entanto, nenhuma dessas alterações foi considerada confiável quando encontrada isoladamente para ser usada no diagnóstico NFOR/SOT (PETIBOIS et al., 2002).

Outro aspecto importante é a relação entre exercício e condição psicológica, sendo que o esforço físico intenso pode afetar, de maneira negativa, o estado de humor do atleta (SAKURAGI; SUGIYAMA, 2006). Desta forma, alterações no comportamento são atualmente aceitas como uma das variáveis consistentes de SOT em humanos, sabendo que as alterações comportamentais podem ser um dos principais sintomas desta condição (COUTTS et al., 2007).

Considerado um estímulo estressor, o exercício físico causa alterações fisiológicas tanto em atletas da espécie humana como em animais, promovendo, por vezes, aumentos ou reduções nas concentrações de certos hormônios, com intuito de suprir o aumento da demanda energética e manutenção da homeostase

(GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). Alterações nas concentrações de cortisol (humanos) e de corticosterona (ratos) revelam que as concentrações de tais hormônios podem ser importantes indicadores de estresse (MÖSTL; PALME, 2002; CONTARTEZE et al., 2007).

A maioria dos estudos sobre FOR/NFOR utilizou roedores no delineamento experimental. Estes modelos experimentais possibilitam que sejam realizadas análises de amostras biológicas que podem contribuir para elucidação dos mecanismos etiopatogênicos envolvidos com a redução do desempenho (PEREIRA et al., 2012). Estas pesquisas utilizaram a corrida em esteira ou a natação, sendo que os roedores apresentam boa resposta ao exercício (GOBATTO et al., 2001).

Atletas de elite e treinadores precisam de métodos simples para prevenção e diagnóstico da SOT. Como possibilidade, a utilização conjunta de biomarcadores comportamentais, musculares e endócrinos pode ser um método para diagnóstico da SOT (TOMAZINI; SILVA, 2014).

1.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos de um protocolo de "overtraining" para o desenvolvimento das condições de FOR e NFOR sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos Wistar com o objetivo de contribuir na busca de marcadores da condição NFOR.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir as condições FOR e NFOR por meio da utilização de um protocolo de "overtraining" e avaliar o desempenho dos ratos por meio de testes de esforço máximo;
- Investigar as possíveis alterações desencadeadas pelas condições de FOR e NFOR a seguir:
 - Comportamentais: por meio de testes comportamentais da determinação das concentrações plasmáticas de corticosterona;

- Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA): por meio das quantificações das concentrações de corticosterona e do peso de glândulas adrenais (índice adrenosomático);
- Bioquímicas: por meio da quantificação da lactatemia e glicemia antes e após a realização de testes de esforço máximo.

1.3. REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1. "Nonfunctional overreaching" (NFOR) e Síndrome do "overtraining" (SOT)

A síndrome de "overtraining", que foi descrita em 1923, tem sido considerada uma patologia enigmática desde sua descoberta (CARFAGNO; HENDRIX, 2014). A etilogia da condição NFOR/SOT está relacionada com programas de treinamento incorretos, notadamente, pelo desequilíbrio entre o volume/intensidade e o tempo de recuperação. Contudo, existem outros possíveis indutores de NFOR/SOT, como treinos monótonos, número elevado de competições e alterações comportamentais (MEEUSEN et al., 2013).

Quando a periodização do treinamento é prescrita inadequadamente e o treino torna-se excessivo, os atletas podem desenvolver a condição NFOR (SILVA; SANTHIAGO; GOBATTO, 2006). Alguns autores afirmaram que a condição NFOR pode evoluir para a SOT, estado clínico que pode ser classificado como "inadaptação prolongada" do atleta (MEEUSEN et al., 2013). Entretanto, observando cuidadosamente a literatura sobre este tema, a distinção entre o estado NFOR e SOT é tênue, pois estas condições são comumente associadas aos mesmos sinais e sintomas, sendo diferenciada apenas pelo tempo de recuperação, onde a duração por meses (Figura 1) pode ser observada nas duas condições (HOHL et al., 2009; CARFAGNO; HENDRIX, 2014). Estas condições podem ser apresentadas pelos atletas de alto rendimento devido as grandes exigências existentes no meio esportivo (CARFAGNO; HENDRIX, 2014).

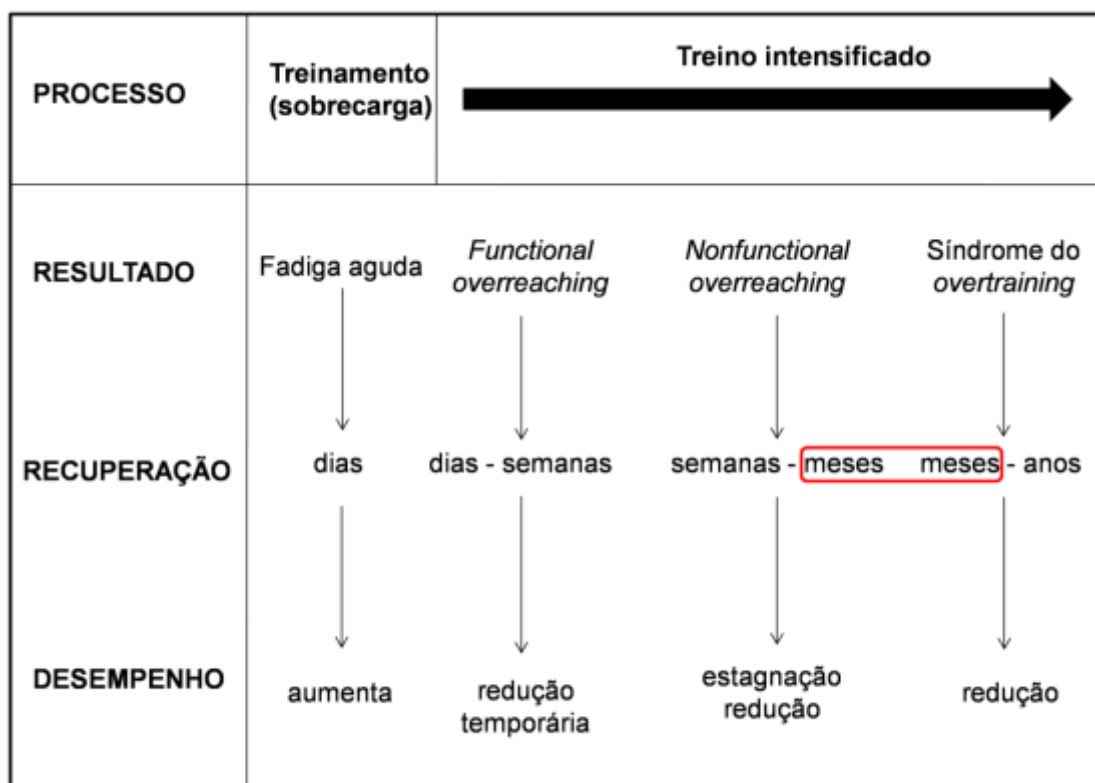


Figura 1. Figura adaptada de Meeusen et al. (2013) dos possíveis resultados do treinamento atlético.

Adicionalmente, em humanos, alguns sintomas que são comumente associados às condições NFOR/SOT podem ser observados na Tabela 1. É importante ressaltar que atletas equinos também demonstraram sinais e sintomas relacionados a essas condições, como mudanças comportamentais relativas a ausência de equilíbrio na relação treinamento:recuperação. Estas foram associadas ao elevado número de competições, concomitante a períodos longos de transporte e mudanças ambientais (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). A ocorrência da condição NFOR/SOT em equinos foi descrita pela primeira vez em cavalos de corrida, por meio de observações de cavalos e éguas que apresentaram sinais de fadiga e redução da aptidão física, bem como perda de peso corpóreo, inapetência e alterações comportamentais (MCGOWAN; WHITWORTH, 2008). Estes sinais são semelhantes aos observados em humanos.

Tabela 1. Sinais e sintomas relacionados à síndrome do "overtraining" e ao "nonfunctional overreaching" em humanos

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

FONTE: ALVES; COSTA; SAMULSKY, 2006; GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007; MCGOWAN; WHITWORTH, 2008.

No esporte, a incidência de NFOR/SOT varia de acordo com a modalidade da atividade exercida, sendo que esportes que envolvem altas cargas de treinamento, onde o corpo está sob grande estresse por longos períodos, como futebol, corridas, natação e ciclismo, frequentemente possuem maior risco de desencadear essas condições, demonstrado maior porcentagem de ocorrência de NFOR/SOT (ALVES; COSTA; SAMULSKI, 2006; CARFAGNO; HENDRIX, 2014). Dentro deste contexto, Armstrong e Vanheest (2002) relataram que estudos têm reportado que os sinais clínicos destas condições já foram observados em 33% dos jogadores de basquete que participam de 4 semanas de treinamento intenso (VERMA; MAKINDROO; KANSA., 1978), 50% dos jogadores de futebol profissional durante uma temporada competitiva de 5 meses, em que o treinamento ocorreu quatro vezes por semana sendo realizado um jogo de campeonato por semana (LEHMANN et al., 1992) e em mais de 60% dos corredores de longa distância durante as suas carreiras atléticas

(MORGAN et al., 1987). Carfagno e Hendrix (2014) salientam que os estudos sobre a incidência e prevalência da SOT são limitados e conflitantes, indicando que entre 5% e 64% dos atletas de elite vivenciam episódios de SOT pelo menos uma vez durante suas carreiras. A redução no rendimento resultante desta síndrome costumeiramente é confundida com falta de estímulo (intensidade), levando, de maneira equivocada, a prescrição de cargas mais elevadas de exercícios pelos treinadores, sendo que desta maneira, os atletas podem ultrapassar seus próprios limites tornando-os mais susceptíveis a desenvolver o NFOR/SOT (HALSON; JEUKENDRUP, 2004; FERRARESSO, 2010).

É notório que a carga ideal é difícil de ser determinada tanto para atletas quanto para seus treinadores, podendo contribuir com a prevalência das condições NFOR/SOT em atletas humanos ou equinos (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007).

Esta síndrome, em esportes de alto nível, tornou-se uma importante intercorrência, sendo observada em atletas que realizam programas de treinamento comumente planejado de maneira equivocada. Mesmo que não exista um consenso de que essas condições causem danos irreversíveis ao atleta, estes estão expostos diariamente ao risco de lesões, desenvolvimento de doenças ou retirada precoce do esporte (ALVES; COSTA; SAMULSKY, 2006), já que o controle para os fatores desencadeados pelo NFOR/SOT é o repouso prolongado (CARFAGNO; HENDRIX et al., 2014), sendo este necessário e essencial para a recuperação física e mental do atleta (ALVES; COSTA; SAMULSKY, 2006). Portanto, é importante que os profissionais e os demais envolvidos no treinamento esportivo compreendam melhor os sintomas e as causas do NFOR/SOT, afim de se obter um diagnóstico antecipado, auxiliando a reduzir a probabilidade de sua ocorrência, tanto para atletas humanos quanto equinos (DA CRUZ; JUNIOR; VIEIRA, 2013).

Existem biomarcadores com potencial para serem empregados no diagnóstico da NFOR/SOT, como hormônios, e indicadores bioquímicos, bem como testes psicológicos e de esforço físico (MEEUSEN et al., 2013). A avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso (VFC) é um dos meios não invasivos para o controle da carga de treino e tem-se sugerido que este parâmetro possa ser um marcador adequado para a SOT, quando realizadas avaliações individuais do atleta (DE FREITAS, MIRANDA, BARRA-FILHO, 2009). A avaliação

da aptidão física ainda representa o “padrão-ouro” no que se refere ao diagnóstico do NFOR/SOT (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006). A identificação de biomarcadores tornaria viável a possibilidade de que treinadores ajustem as cargas de treinamento ideais de modo que possa evitar o desenvolvimento do NFOR/SOT, melhorando a aptidão física do atleta e sua qualidade de vida (ALVES; COSTA; SAMULSKY, 2006). Em humanos, fatores de estresse pessoais, como perda de sono, aspectos sociais, econômicos, exposição a tensões ambientais, pressões ocupacionais, dificuldades interpessoais, viagens e monotonia contribuem para o aumento do risco de desenvolver a SOT (MEEUSEN et al., 2013). A realização de experimentos sobre NFOR/SOT em roedores é importante, pois desta maneira elimina-se a possibilidade de acumulação de estresse de situações não referentes ao treinamento, como as citadas anteriormente, que é um fator em estudos com humanos (PEREIRA et al., 2012). Ademais, tal modelo possibilita que seja realizada a análise de amostras teciduais e sanguíneas, permitindo o esclarecimento dos diversos mecanismos envolvidos nestas condições (PEREIRA et al., 2012).

1.3.2. NFOR/SOT, eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e cortisol

O exercício físico é um estímulo estressante que pode influenciar a secreção basal de diversos hormônios, notadamente o cortisol (TABATA et al., 1989; GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007; RIVERO et al., 2008). Os principais produtos hormonais, como a adrenalina, noradrenalina e o cortisol tem como função redistribuir os "combustíveis" metabólicos, manter a glicose no sangue e aumentar a capacidade de resposta do sistema cardiovascular (MEEUSEN et al., 2013), sendo que o cortisol desempenha um importante papel em relação a regulação da ansiedade (CHAMPAGNE et al., 2008).

Por muito tempo tem-se levantado a hipótese da ocorrência de desregulação central mediada por hormônios durante a SOT, relacionada a uma inadaptação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e que a avaliação das concentrações hormonais poderiam auxiliar na detecção desta patologia (MEEUSEN et al., 2013). Neste contexto, durante o período de restabelecimento da homeostase, devido ao estresse provocado pelo exercício, os eventos hormonais podem ser divididos em

catabólicos, com menor tolerância ao esforço seguido pelos anabólicos, com maior capacidade de adaptação e desempenho (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). Um dos sistemas ativado nesta fase é o eixo HHA. Quando a homeostase não é restaurada, o organismo vivencia o estresse crônico que estimula a ativação crônica do sistema endócrino, provavelmente desencadeando uma desordem neuroendócrina como a observada na SOT (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007).

Esta estimulação crônica do eixo HHA pode levar ao aumento nas concentrações de cortisol em humanos e de corticosterona nos roedores, hormônios que em altas concentrações podem desencadear diversas respostas não desejáveis ao organismo, como diminuição da resposta imunológica e resistência a insulina (CONTARTEZE et al., 2007; RIVERO et al., 2008), bem como o surgimento de psicopatologias, como depressão e ansiedade (DE KLOET; KARST; JOËLS, 2008).

Artigo de revisão sobre a síndrome de "overtraining", que comparou humanos com equinos, revelou que exercícios de alta intensidade ou resistência (endurance) causam aumento de ACTH e cortisol (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). A avaliação das concentrações de cortisol após testes de esforço máximo de campo e em esteira demonstraram que a síndrome de "overtraining" em cavalos de corrida está associada a uma diminuição da concentração deste hormônio (GOLLAND et al., 1999; HAMLIN; SHEARMAN; HOPKINS, 2002). Em humanos, estudo com indivíduos em OT relatou concentrações de cortisol elevadas quando comparadas com aquelas obtidas em indivíduos com atividade física normal (URHAUSEN; GABRIEL; KINDERMANN, 1998). Em estudo realizado com ratos em exercício agudo, a realização da natação na máxima fase estável de lactato e 25% superior a esta provocou aumentos das concentrações de ACTH e corticosterona comparadas aos animais em repouso (CONTARTEZE et al., 2007). No entanto, nem sempre são observados aumentos nas concentrações séricas desse hormônio na condição NFOR/SOT (HALSON; JEUKENDRUP, 2004).

É importante ressaltar que existe grande divergência de resultados na literatura em relação as alterações nas concentrações de cortisol e a condição NFOR/SOT (KREHER; SCHWARTZ, 2012). Alguns autores não verificaram alteração na concentração plasmática basal de cortisol em atletas em OT (HOOPER et al., 1993; URHAUSEN; GABRIEL; KINDERMANN, 1998). Outros estudos

observaram um aumento (BARRON et al., 1985; ADLERCREUTZ et al., 1986) e até mesmo diminuição (LEHMANN et al., 1992).

Diversas hipóteses foram propostas para explicar a ocorrência da disfunção no eixo HHA provocada pelo NFOR/SOT. Vários estudos forneceram evidências de que o "overtraining" está associado a disfunção hipotalâmica, sendo esta associada com um leve grau de insensibilidade da hipófise (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). Foi identificado uma disfunção no eixo HHA em pesquisa com atletas com SOT, sendo que esta foi associada a ocorrência de hipersensibilidade da hipófise seguida por exaustão/esgotamento dos hormônios produzidos por este eixo (MEEUSEN et al., 2004), sendo responsável por uma resposta hormonal prejudicada (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). Ademais, foi sugerido uma possível insuficiência da adrenal com consequente redução das concentrações de cortisol circulante, esta ocorrência esta relacionada com estresse físico causado pelo "overtraining" podendo causar esgotamento dos hormônios produzidos por essas glândulas (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002; BROOKS; CARTER, 2013).

Além da quantificação das concentrações de corticosterona em roedores, outro método indireto de análise da possível resposta estressante provocada pelo exercício e da eventual disfunção das adrenais é por meio da pesagem destas glândulas, fazendo-se o peso relativo da glândula em relação ao peso corpóreo (índice adrenosomático), pois quando sua atividade está muito aumentada e por um longo período de tempo essa glândula pode sofrer alterações em seu peso (REAL, 2009). Neste contexto, estudos com ratos treinados em esteira mostraram uma tendência para um maior peso relativo da adrenal, demonstrando que a corrida resultou em hipertrofia adrenal (MORASKA et al., 2000; LALANZA et al., 2012), resultado associado a adaptações potencialmente negativas do exercício. Outro estudo com roedores verificou no grupo submetido ao treinamento anaeróbio em escada um aumento de 50% no peso da adrenal (RODRIGUES; BORIN; DA SILVA, 2016). A hipertrofia adrenal faz parte de alterações fisiopatológicas comuns produzidas pelo estresse crônico e ocorre possivelmente devido a exposição repetida ao estressor (exercício) que causa a ativação crônica do eixo HHA (MORASKA et al., 2000). Este estímulo crônico da glândula adrenal resultará em

proliferação de células corticais adrenais causando a hipertrofia (MORASKA et al., 2000).

Embora existam estudos e hipóteses relacionadas a participação dos hormônios produzidos pelo eixo HHA e a disfunção neuroendócrina observada na SOT, ainda existe uma lacuna na literatura a respeito da relação entre HHA, corticosterona e comportamento. Informações detalhadas sobre as mudanças hormonais em conjunto com alterações no índice adrenosomático bem como no comportamento poderiam fornecer uma maior compreensão no entendimento da adaptação normal do eixo ao treinamento e as adaptações patológicas relacionadas ao NFOR/SOT. Portanto, estudos que busquem investigar as alterações destes fatores modulados pelo NFOR/SOT em ratos Wistar em conjunto com avaliações que envolvam variáveis comportamentais e bioquímicas são essenciais para auxiliar no entendimento dos sinais e sintomas provocados por esta patologia.

1.3.3. NFOR/SOT e aspectos comportamentais

A presença de alterações comportamentais em casos de NFOR/SOT é relativamente conhecida. O pesquisador William Morgan, nos anos 80, desenvolveu um estudo seminal sobre este tema, em nadadores universitários e em outros atletas por meio de questionários de perfil de estados de humor (POMS - "Profile of Mood States"), que tem por finalidade avaliar as alterações comportamentais. Estes indivíduos relataram elevações nos humores negativos, como depressão, tensão, raiva e redução nos humores positivos durante os períodos de treinamento rigoroso (DE FREITAS; MIRANDA; BARA FILHO, 2009; MEEUSEN et al., 2013). A avaliação psicológica tem sido muito utilizada na tentativa de analisar os efeitos das cargas de treino (KELLMANN, 2002), sendo hoje considerada um dos métodos mais eficazes e não invasivos para detecção e prevenção das condições de NFOR/SOT em atletas humanos, realizada em conjunto com registros de desempenho e alterações hormonais (MORGAN et al., 1987; RIETJENS et al., 2005; GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007).

Com relação aos sintomas psicológicos e comportamentais observados no NFOR/SOT, alguns estudos revelaram uma relação proporcional entre os distúrbios de humor e as cargas de treinamento (FLYNN et al., 1994; SILVA; SANTIAGO; GOBATTO, 2006), que muitas vezes precedem alterações nas concentrações de cortisol em humanos (O'CONNOR et al., 1989; COUTTS et al., 2007; MEEUSEN et al., 2013). Equinos podem apresentar modificações comportamentais relacionados ao excesso de treinamento. Observaram queda de desempenho acompanhada por sintomas como o nervosismo, falta de vontade de iniciar sessões, irritabilidade, sendo que estes animais tornaram-se mais difíceis de lidar (PERSSON, 1983; MCGOWAN; WHITWORTH, 2008; RIVERO et al., 2008), revelando distúrbios comportamentais semelhantes aos encontrados em humanos.

Alterações comportamentais em roedores em respostas a diferentes intensidade de exercício físico são descritas na literatura, no entanto, estudos envolvendo roedores submetidos a protocolos de indução de FOR e NFOR/SOT previamente definidos e distúrbios comportamentais não foram encontrados. Desta maneira torna-se clara a importância do desenvolvimento de estudos relacionados às alterações de comportamento causadas pelo NFOR/SOT em roedores, visando auxiliar a desvendar as possíveis vias envolvidas no desencadeamento dos sintomas psicopatológicos provocados por essas condições, sendo que futuramente estes estudos podem contribuir para o desenvolvimento de possíveis tratamentos para os sintomas psicológicos encontrados em atletas de alto rendimento.

A avaliação comportamental em roedores é realizada por meio da utilização de testes comportamentais como o labirinto em cruz elevado (LCE) e o campo aberto (CA) (Figuras 2 e 3). Estes modelos foram desenvolvidos com o objetivo de se avaliar os efeitos ansiolítico ou ansiogênico de determinados fármacos. Também para estudos sobre emocionalidade de ratos em ambientes não familiares, possibilitando a avaliação da atividade exploratória sobre um ambiente novo e não familiar (RODGERS; DALVI, 1997; HO; EICHENDORFF; SCHWARTING, 2002).



Figura 2. Labirinto em cruz elevado



Figura 3. Campo aberto

1.3.4. NFOR/SOT e lactato

Durante os últimos anos, foi descoberto que o lactato não é somente um mero produto residual do metabolismo celular, mas pode atuar também como substrato energético para a musculatura esquelética, sendo a literatura recente revelou que possivelmente os neurônios também podem utilizar este metabólito para produção de energia e como neurotransmissor (PROIA et al., 2016).

O lactato é um monocarboxilato, sendo um composto produzido no final da glicólise anaeróbia, processo que a glicose é clivada enzimaticamente à piruvato, que por sua vez pode entrar na mitocôndria para ser oxidado no ciclo de Krebs ou pode ser convertido a lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (BERGERSEN, 2007). Dependendo do tipo de fibra muscular pode haver taxa de glicólise alta durante o exercício (BONEN, 2001; BERGERSEN, 2007).

Durante o exercício de baixa intensidade, o metabolismo muscular produz energia (ATP) predominantemente pela via aeróbia, a partir da contração de fibras oxidativas, tipo I. Com o aumento da intensidade do exercício, a demanda por energia (ATP) aumenta. Desta maneira, a participação da via anaeróbia torna-se fundamental para que o atleta atinja altas velocidades, ocorrendo mobilização de fibras musculares conhecidas como glicolíticas, tipo II (CARVALHO; MASUDA; POMPEU, 2005). Dependendo da aptidão física do atleta, nesta fase ocorre acúmulo de lactato sanguíneo indicando maior contribuição do metabolismo anaeróbio para produção de ATP (CARVALHO; MASUDA; POMPEU, 2005).

Em exercícios de intensidade moderada a intensa, o carboidrato é o principal substrato energético envolvido, sendo este estocado sob a forma de glicogênio no músculo que durante a atividade física é rapidamente depletado, sendo que em níveis críticos, sua depleção está associada à fadiga, sendo que esta depleção de glicogênio durante o exercício parece possuir influências tanto nas concentrações plasmáticas de glicose e lactato (CONLEE et al., 1987).

Entre os marcadores bioquímicos das condições NFOR/SOT, os mais citados são a glutamina plasmática, a atividade da creatina quinase, uréia e o lactato sanguíneo (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006). O lactato é um metabólito produzido constantemente em repouso por diversos tecidos do corpo incluindo o músculo, este é produzido principalmente durante o exercício predominantemente anaeróbio (ARAÚJO et al., 2008). Portanto, a análise deste metabólito em conjunto com outros parâmetros tem se mostrado um bom indicador de esforço anaeróbio, o que permite sua utilização como um marcador da NFOR/SOT durante o treinamento em conjunto com a avaliação de outros parâmetros (BOSQUET; LEGER; LEGROS, 2001; BONIFAZI; SARDELLA; LUPPO, 2000).

Em estudos com NFOR/SOT realizados em nadadores, corredores, ciclistas e triatletas foram observados redução da aptidão física acompanhada por uma redução na concentração máxima de lactato (URHAUSEN; KINDERMANN, 2002) e redução do lactato sanguíneo em resposta a testes submáximos (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006). Outros estudos demonstraram que indivíduos que apresentaram "overtraining" e "overreaching" obtiveram reduções nas concentrações de lactato em teste incremental quando comparados ao controle (BOSQUET; LEGER; LEGROS, 2001). Em cavalos em "overtraining", diferentemente do que é observado em humanos, foi descrito um aumento das concentrações de lactato após testes máximos e submáximos (HAMLIN; SHEARMAN; HOPKINS, 2002).

A avaliação da lactatemia sanguínea é um método utilizado na rotina durante o condicionamento atlético (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006), sendo relevante diferenciar os efeitos do condicionamento dos efeitos do NFOR/SOT, tornando importante desvendar se as quantificações das concentrações de lactato poderiam ser usadas como instrumento no diagnóstico destas condições. No entanto, uma das dificuldades existentes é que tanto o condicionamento como o NFOR/SOT

promovem deslocamento da curva do lactato para a direita (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006), evento comumente associado a melhoria na aptidão física. Contudo, no NFOR/SOT este deslocamento pode estar relacionado ao "paradoxo do lactato" (GRAAF-ROEFSELMA et al., 2007), que é caracterizado pelo deslocamento da curva devido a depleção nas reservas de glicogênio. Por ser uma técnica acessível e bastante utilizada no meio esportivo, o controle do lactato pode ser uma ferramenta viável na prevenção do NFOR/SOT (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006), por isso estudos que busquem elucidar os componentes relacionados as alterações neste metabólito em conjunto com as avaliações da aptidão física são importantes, sendo capaz de contribuir no desenvolvimento de técnicas fáceis e viáveis que possam facilitar o acompanhamento do treinamento, auxiliando na melhora da aptidão física e evitando a redução da performance atlética bem como do desenvolvimento do NFOR/SOT.

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos que utilizam as concentrações sanguíneas e plasmáticas de lactato como indicadoras da intensidade do esforço realizado por ratos durante protocolos de indução de NFOR/SOT, levando em consideração que este metabólito é um possível indicar dessas condições.

Dentro do contexto geral da NFOR/SOT, no presente estudo, nós obtivemos resultados relevantes a partir do desenvolvimento de FOR e NFOR obtido a partir de um delineamento experimental com roedores, que realizaram um protocolo de "overtraining" em modelo animal desenvolvido e caracterizado pela equipe do Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (HOHL et al., 2009). Desta maneira, o próximo capítulo intitulado "Treinamento e "overtraining" induziram alterações comportamentais e bioquímicas em ratos Wistar" está apresentado na forma de artigo. Neste manuscrito foram apresentadas informações sobre alterações comportamentais e principalmente sobre a dinâmica das concentrações plasmáticas máximas de lactato e glicose ao longo do período experimental.

1.3.5. REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, H.; HÄRKÖNEN, M.; KUOPPASALMI, K.; NÄVERI, H.; HUHTANIEMI, I.; TIKKANEN, H.; KARVONEN, J. Effect of training on plasma anabolic and catabolic steroid hormones and their response during physical exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v. 7, n. 1, p. 27-28, 1986.

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

ARAÚJO, G. G.; GOBATTO, C. A.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; CAVAGLIERI, C. R.; VERLENGIA, R. Respostas fisiológicas para detectar o *overtraining*. **Journal of Physical Education**, v. 19, n. 2, p. 275-289, 2008.

ARMSTRONG, L.E.; VANHEEST, J.L. The unknown mechanism of the *overtraining* syndrome clues from depression and psychoneuroimmunology. **Sports Medicine**, v. 32, n. 3, p. 185-209, 2002.

AUBRY, A.; HAUSSWIRTH, C.; LOUIS, J.; COUTTS, A. J.; BUCHHEIT, M.; LE MEUR, Y. The development of functional overreaching is associated with a faster heart rate recovery in endurance athletes. **Plos one**, v. 10, n. 10, p. e0139754, 2015.

BARRON, J. L.; NOAKES, T. D.; LEVY, W.; SMITH, C.; MILLAR, R. P. Hypothalamic Dysfunction in Overtrained Athletes*. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 4, p. 803-806, 1985.

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

BONEN, A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. **European journal of applied physiology**, v. 86, n. 1, p. 6-11, 2001.

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

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

BROOKS, K. A.; CARTER, J. G. Overtraining, exercise, and adrenal insufficiency. **Journal of novel physiotherapies**, v. 3, n. 125, 2013.

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

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

CHAMPAGNE, D. L.; BAGOT, R. C.; VAN HASSELT, F.; RAMAKERS, G.; MEANEY, M. J.; DE KLOET, E. R.; KRUGERS, H. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 23, p. 6037-6045, 2008.

CONLEE, R. K. 1 Muscle Glycogen and Exercise Endurance: A Twenty-Year Perspective. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 15, n. 1, p. 1-28, 1987.

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

COUTTS, A.; REABURN, P.; PIVA, T. J.; MURPHY, A. Changes in selected biochemical, muscular strength, power, and endurance measures during deliberate overreaching and tapering in rugby league players. **International Journal of Sports Medicine**, v. 28, n. 02, p. 116-124, 2007.

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

DACRUZ, R. S., JUNIOR, A. J. C., VIEIRA, T. C. Diagnóstico do *overtraining* em atletas de alto rendimento: revisão de literatura. **Revista Movimenta ISSN**, v. 6, n. 1, p. 2013.

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

DE KLOET, E. R.; KARST, H.; JOËLS, M. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 268-272, 2008.

FERRARESSO, R. L. P. **Estudo da relação entre ataque oxidativo, sistema de defesa antioxidante e atividade mitocondrial em ratos submetidos a um protocolo de indução ao *overtraining* em esteira.** 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2010.

FLYNN, M. G.; PIZZA, F. X.; BOONE, J. B.; ANDRES, F. F.; MICHAUD, T. A.; RODRIGUEZ-ZAYAS, J. R. Indices of training stress during competitive running and swimming seasons. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15, n. 01, p. 21-26, 1994.

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.

GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; DE AZEVEDO, J. R. M.; dos SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 130, n. 1, p. 21-27, 2001.

GOLLAND, L. C.; EVANS, D. L.; STONE, G. M.; TYLER-MCGOWAN, C. M.; HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. Plasma cortisol and β -endorphin concentrations in trained and over-trained Standardbred racehorses. **Pflügers Archiv**, v. 439, n. 1-2, p. 11-17, 1999.

GRAAF-ROELFSEMA, E.; KEIZER, H. A.; VAN BRED, 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.

HALSON, S.; JEUKENDRUP, A. Does *overtraining* exist? An analysis of overreaching and *overtraining* research. **Sports Medicine**, Baltimore, v. 34, n. 14, p. 967-981, 2004.

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

HO, Y.J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. On functionals of linear processes with estimated parameters. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v.12, p.136, 2002.

HOHL, R.; FERRARESSO, R. L.; DE OLIVEIRA, R. B.; LUCCO, R.; BREZIKOFER, R.; DE MACEDO, D. V. Development and characterization of an *overtraining* animal model. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 5, p. 1155-63, 2009.

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

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

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

LALANZA, J. F.; SANCHEZ-ROIGE, S.; GAGLIANO, H.; FUENTES, S.; BAYOD, S.; CAMINS, A.; ESCORIHUELA, R. M. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 11, p. 1745-1754, 2012.

LEHMANN, M.; SCHNEE, W.; SCHEU, R.; STOCKHAUSEN, W.; BACHL, N. Decreased nocturnal catecholamine excretion: parameter for an overtraining syndrome in athletes? **International Journal of Sports Medicine**. v.13,p. 236-242,1992.

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

MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; FOSTER, C.; FRY, A.; GLEESON, M.; NIEMAN, D.; RAGLIN, J.; RIETJENS, G.; STEINACKER J.; URHAUSEN, A. Prevention, diagnosis, and treatment of the *overtraining* syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 1, p. 186-205, 2013.

MEEUSEN, R.; PIACENTINI, M. F.; BUSSCHAERT, B.; BUYSE, L.; DE SCHUTTER, G.; STRAY-GUNDERSEN, J. Hormonal responses in athletes: the use of a two bout exercise protocol to detect subtle differences in (*over*) *training* status. **European Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 2-3, p. 140-146, 2004.

MORASKA, A., DEAK, T.; SPENCER, R. L.; ROTH, D.; FLESHNER, M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 4, p. 1321-1329, 2000.

MORGAN, W. P.; BROWN, D. R.; RAGLIN, J. S.; O'CONNOR, P. J.; ELLICKSON, K. A. Psychological monitoring of overtraining and staleness. **British Journal of Sports Medicine**, v. 21, p.107-114. 1987.

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

O'CONNOR, P. J.; MORGAN, W. P.; RAGLIN, J. S.; BARKSDALE, C. M. KALIN, N. H. Mood state and salivary cortisol levels following overtraining in female swimmers. **Psychoneuroendocrinology**, v. 14, n. 4, p. 303-310, 1989.

PEREIRA, B. C.; LUIS FILHO, A. L.; ALVES, G. F.; PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; SOUZA, C. T.; CINTRA, D. E.; SAAD, M. J.; 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.

PERSSON, S. G. B. Evaluation of exercise tolerance and fitness in the performance horse. **Equine Exercise Physiology**, p. 441-457, 1983.

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.

PROIA, P.; DI LIEGRO, C. M.; SCHIERA, G.; FRICANO, A.; DI LIEGRO, I. Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1450, 2016.

REAL, C.C. **Efeitos do exercício físico sobre a expressão de receptores de glutamato no encéfalo de ratos**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RIETJENS, G. J. W. M.; KUIPERS, H.; ADAM, J. J.; SARIS, W. H. M.; VAN BRED, E.; VAN HAMONT, D. A.; KEIZER, H. A. Physiological, biochemical and psychological markers of strenuous training-induced fatigue. **International Journal of Sports Medicine**, v. 26, n. 01, p. 16-26, 2005.

RIVERO, J. L. L.; BRED, E. V.; ROGERS, C. W.; LINDNER, A.; OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. S. Unexplained underperformance syndrome in sport horses: classification, potential causes and recognition. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 6, p. 611-618, 2008.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v.21, n.6, p.801-10, 1997.

RODRIGUES, M. D.; BORIN, S. H.; DA SILVA, C. A. Relações metabólicas em ratos sob o treinamento anaeróbico em escada. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v.38, n.1, p. 1-5, 2016.

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

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

SILVA, A. S.; SANTHIAGO, V.; GOBATTO, C. A. Compreendendo o *overtraining* no desporto: da definição ao tratamento. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 6, n. 2, p. 229-238, 2006.

TABATA, I.; ATOMI, Y.; MIYASHITA, M. Bi-phasic change of serum cortisol concentration in the morning during high-intensity physical training in man. **Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme**, v. 21, n. 4, p. 218, 1989.

TOMAZINI, F.; SILVA, E.V.M. Idade cronológica e maratona: um estudo a partir dos resultados obtidos por atletas brasileiros na última década e a opinião de seus treinadores. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 12, n. 2, 2014.

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

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

VERMA, S. K.; MAKINDROO, S. R.; KANSA, D.K. Effect of four weeks of hard physical training on certain physiological and morphological parameters of basketball players. **Journal of Sports Medicine**, v.18,p. 379-384, 1978.

CAPÍTULO 2 - Treinamento e "overtraining" induziram alterações comportamentais e bioquímicas em ratos Wistar

2. INTRODUÇÃO

O treinamento de atletas de alto rendimento é um procedimento complexo, onde deve existir equilíbrio entre as cargas de treinamento e a recuperação, sendo que o objetivo principal é fornecer ao organismo estímulos adequados para induzir mudanças adaptativas que conduzirão num incremento da performance (27). Neste contexto, elevações nas intensidades de treinamento produzem resposta estressante e são costumeiramente realizadas por treinadores na tentativa de melhorar a aptidão física dos atletas (1). No entanto, muitas vezes o nível de estímulo físico imposto ao atleta ultrapassa o limite. Tais fatores podem provocar desequilíbrios, como o desencadeamento do "overtraining" (OT) (27).

Tendo em vista o conflito de nomenclatura existente na literatura sobre OT, no presente estudo seguimos o posicionamento da "Joint Consensus Statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine" (23), que definiu "overtraining" como um processo de intensificação do treinamento com possível indução das condições "functional overreaching¹" (FOR), "nonfunctional overreaching²" (NFOR) e a síndrome de "overtraining" (SOT).

Quando o equilíbrio entre o ciclo de incremento progressivo do treinamento e recuperação é interrompido, pode ocorrer a condição conhecida como FOR (1). Este processo pode ser incluído na periodização do programa de treinamento, pois quando são prescritos períodos de recuperação adequados, pode ocorrer aumento da performance do atleta, efeito conhecido como "supercompensação" (23). A condição NFOR é caracterizada pela intensificação contínua do treinamento associada à prescrição incorreta da recuperação (27), tendo como resultado a estagnação ou redução do desempenho, condição que pode perdurar semanas ou meses, podendo apresentar sinais clínicos, fisiológicos e comportamentais (1,16,18,23). A condição NFOR pode evoluir, ao longo do tempo, para a SOT,

¹Functional overreaching= overreaching funcional

²Nonfunctional overreaching = overreaching não funcional

síndrome que possui etiologia multifatorial, provocando redução da capacidade física acompanhada de uma "inadaptação psicossomática" do atleta, possuindo tempo de recuperação ainda mais prolongado (5,27).

Além da redução de desempenho e alterações comportamentais, como ansiedade, depressão e distúrbios de humor, alguns sinais clínicos são associados à NFOR/SOT em humanos. Entre eles, destacam-se reduções de apetite e peso corpóreo, distúrbios de sono, aumento de enfermidades respiratórias, alterações cardiovasculares e redução na concentração plasmática de lactato [lac] após testes de esforço máximo (4,10). No entanto, quando observadas isoladamente, nenhuma destas ocorrências foi considerada confiável para o diagnóstico destas condições (18,23).

A interação entre cargas progressivas e extenuantes podem produzir distúrbios comportamentais que, por vezes, podem preceder alterações nos biomarcadores bioquímicos e endócrinos da resposta estressante, como o lactato e o cortisol (7,11,23). Estudos que destacaram fatores desencadeantes para indução de NFOR/SOT, como fadigas sucessivas (17), demonstraram que os indicadores comportamentais podem ter sensibilidade diagnóstica maior, sendo mais consistentes quando comparados aos fisiológicos, podendo ser uma ferramenta eficaz para diagnóstico e prevenção de NFOR/SOT em atletas humanos (33).

As equipes multidisciplinares que monitoram os atletas de alto rendimento têm dificuldade para prevenir ou estabelecer o diagnóstico de NFOR/SOT (37), sendo que estes indivíduos possuem alta incidência dessas condições durante suas carreiras (27). Variáveis comportamentais, bem como, indicadores fisiológicos de treino e desempenho devem ser avaliados sob uma perspectiva integrada (5). Neste sentido, faz-se necessário que testes de desempenho realizados sistematicamente, em conjunção com a quantificação da [lac], sejam relacionados com resultados obtidos a partir de testes comportamentais que possam avaliar ansiedade, depressão, medo, entre outros (17).

Parece claro que estudos sobre NFOR/SOT induzida experimentalmente em humanos, possuem um limite ético entre pesquisadores e a sociedade, devido aos impactos causados por essas condições (15). Portanto, o desenvolvimento e a utilização de modelos experimentais com roedores pode ser vantajosa como método

para o conhecimento das variáveis envolvidas na etiopatogenia dos distúrbios comportamentais e fisiológicos presentes na FOR-NFOR/SOT.

Estas modificações comportamentais podem ter componentes neuro-endócrinos, como das vias gabaérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas. Adicionalmente, são descritas algumas alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) na NFOR/SOT (11), sendo que o exercício físico crônico pode modificar as concentrações de cortisol em humanos (11), bem como de corticosterona em ratos (6). Este fato evidencia a necessidade de se quantificar estes indicadores de estresse no organismo. Alguns estudos relacionando o NFOR/SOT e cortisol não verificaram alteração na concentração de cortisol de repouso em atletas sob condição de "overtraining" (24), enquanto outros observaram aumento (35) e até mesmo diminuição (20). É importante ressaltar que os resultados encontrados na literatura em relação a este hormônio são bastante divergentes (25).

Do ponto de vista bioquímico, o principal marcador do NFOR/SOT pode ser o lactato plasmático, que pode ser avaliado em conjunto com a glicemia, sendo indicador da necessidade de utilização da via glicolítica anaeróbia para contração muscular. Isto permite a avaliação da fadiga nas condições FOR e NFOR/SOT (2). Alguns estudos mostraram que atletas humanos de resistência, sob condição NFOR/SOT podem apresentar diminuição na $[\text{lac}]_{\text{máx}}$ (5,37). Notou-se também redução nas $[\text{lac}]_s$ em resposta a testes submáximos (11,12,37), bem como mitigações nas $[\text{lac}]_s$ em teste de esforço incremental (2). A SOT foi estudada em modelos experimentais em roedores (29) e a indução de FOR/NFOR usando tais métodos indicou que a redução do desempenho parece ser a única característica consistente quando comparado a atletas humanos (11). Portanto, estudos sobre testes de esforço máximo são considerados essenciais para diagnóstico de tais condições (23), sendo que a dinâmica do lactato parece ser lacuna nos roedores em FOR/NFOR.

Até onde sabemos, não foram realizados estudos da influência da FOR/NFOR sobre variáveis comportamentais, bioquímicas e hormonais em roedores. Visando a auxiliar na busca por marcadores desta disfunção, nossa hipótese foi relacionada com efeito ansiogênico e/ou depressor e as alterações bioquímicas e hormonais provocadas pelo modelo de indução de FOR e NFOR. Pensando em responder esta

questão, nós investigamos a influência de um protocolo de "overtraining" (15) para indução de FOR/NFOR sobre o comportamento, concentrações de lactato, glicose e corticosterona em ratos Wistar.

2.1. MÉTODOS

2.1.1. Animais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal/SP-Brasil (nº 23593/15). Inicialmente utilizaram-se 100 ratos Wistar machos, jovens, peso corpóreo (PC) entre 150 e 200 g, alojados no biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal do Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Jaboticabal/SP. Os ratos foram mantidos em ciclo de claro-escuro invertido 12:12 h (luz das 18:00 - 6:00 h) com temperatura ambiente de aproximadamente 23°C. Ração para roedores (Agromix Nutrição Animal - Jaboticabal/SP- Brasil) e água foram fornecidos "ad libitum".

2.1.2. Protocolo de "overtraining" (PO). O protocolo "overtraining" utilizado foi desenvolvido e caracterizado pela equipe do Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX) na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas/SP) (15) com um período adaptativo de três semanas e adição de uma semana de treinamento ao final do PO, na qual foram realizadas 4 sessões diárias e duas horas de pausa entre elas (Tabela 1). Os ratos foram adaptados à esteira composta por 12 pistas individuais que possui grades de choque localizadas posteriormente a manta de rolamento (AVS projetos - São Carlos/SP - Brasil). Este dispositivo fornece estímulo elétrico de 1,5 mA, sendo considerado suave (15). Após este procedimento, procedeu-se a exclusão de 25 ratos que não andaram voluntariamente na esteira. Após o período adaptativo, os ratos foram submetidos ao PO por 12 semanas. Estas foram organizadas em 5 fases (F1-F5) de treinamento na esteira. Semanalmente, a prescrição de treino foi de 5 dias consecutivos de sessões de exercício, com 2 dias subsequentes de repouso passivo para recuperação. As sessões de treino durante o PO ocorreram sempre no ciclo escuro, que corresponde ao período de atividade dos ratos.

A F1 foi composta por 4 semanas. Nesta fase houve incremento tanto da velocidade como na duração de cada sessão. Tal procedimento teve como objetivo aumentar a adaptação à esteira e a aptidão física dos ratos. Na F2, a velocidade, bem como a duração alcançadas ao final da F1 ($25 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}/60 \text{ min}$) foram mantidas por mais 4 semanas. Nas 4 últimas semanas de condicionamento, a frequência de sessões diárias foi aumentada para 2, 3 e 4 vezes e o período de recuperação entre estas foi restringido a quatro, três e duas horas (F3, F4 e F5, respectivamente). Nestas três fases foi mantida a velocidade e a duração das sessões da F2. O propósito destas fases foi promover desequilíbrio entre sobrecarga e recuperação. Ao final desse período parte dos ratos foi submetida a uma fase de recuperação passiva que perdurou duas semanas (RP1-RP2). Neste período aplicou-se os testes comportamentais (Tabela 1).

TABELA 1. Protocolo de "overtraining" (15).

Fases do Protocolo	Semana	Hora de execução	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Frequência de sessões diárias	Recuperação (horas)
Adaptação pré PO	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(F1)	1 ^a	13:00-17:00	15	20	1x	24
	2 ^a	13:00-17:00	20	30	1x	24
	3 ^a	13:00-17:00	23	45	1x	24
	4 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
Fase 2(F2)	5 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
	6 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
	7 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
	8 ^a	13:00-17:00	25	60	1x	24
Fase 3 (F3)	9 ^a	6:00-18:00	25	60	2x	4
Fase 4 (F4)	10 ^a	6:00-18:00	25	60	3x	3
Fase 5 (F5)	11 ^a	6:00-18:00	25	60	4x	2
	12 ^a	6:00-18:00	25	60	4x	2
Recuperação passiva	1 ^a (RP1)	Sem treino (fim do protocolo) - Realização testes comportamentais				
	2 ^a (RP2)	Sem treino (fim do protocolo)				

PO= Protocolo de "overtraining"

2.1.3. Testes de desempenho. O delineamento experimental para indução de FOR e NFOR pode ser visualizado na Figura 1. Aplicaram-se testes de esforço máximo (Tmáx) para avaliação do desempenho dos ratos. Todos os testes foram realizados 60 h após a última sessão de treino semanal, sendo que os ratos retornaram às suas atividades de treino após 48 h de repouso.

Todos os ratos foram pesados imediatamente antes aos Tmáxs, sendo que estes PCs foram utilizados para o cálculo do desempenho. Os Tmáxs iniciaram numa velocidade de 12 m.min⁻¹, que foi incrementada 1 m.min⁻¹ a cada 2 min, até que a velocidade de 20 m.min⁻¹ fosse atingida. Ato contínuo, incrementou-se a velocidade para 2 m.min⁻¹ a cada 3 min. Este acréscimo foi mantido até que os ratos atingissem a exaustão, caracterizada quando os ratos tocassem a grade de estímulo elétrico cinco vezes no período de 1 min.

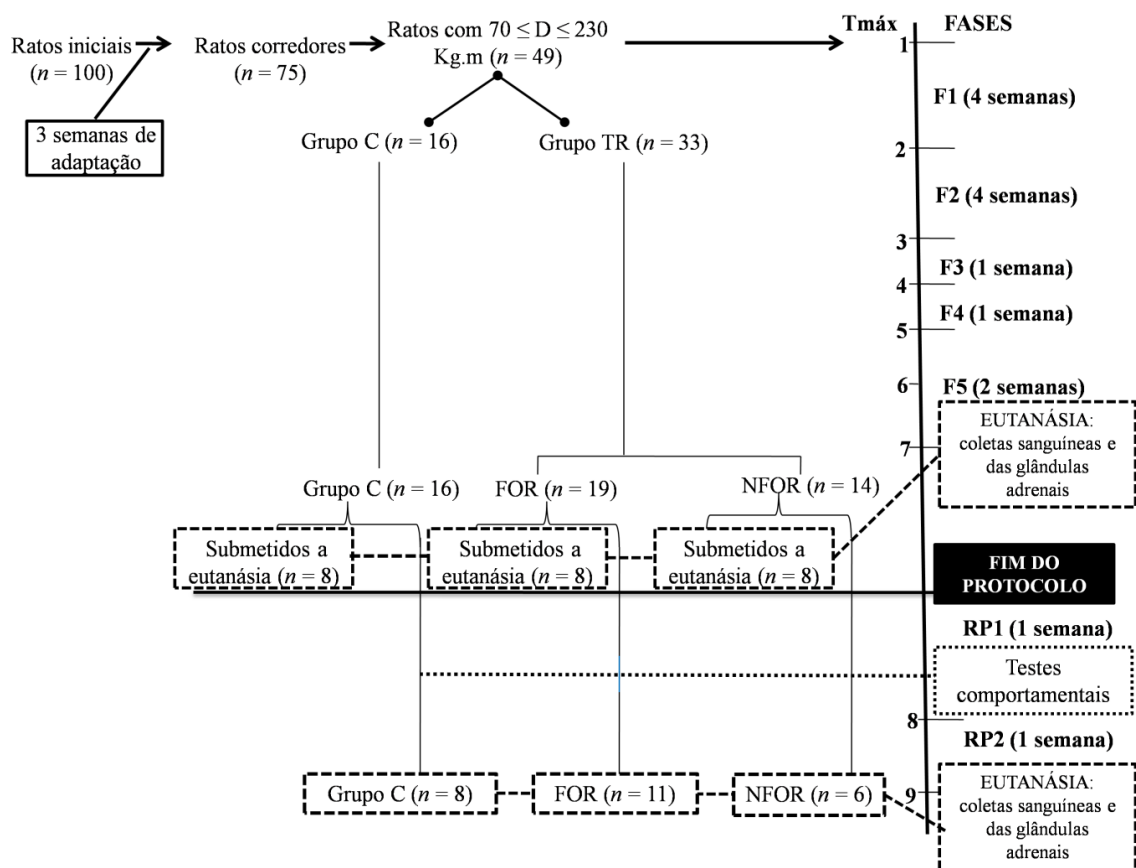


FIGURA 1 - Fluxograma do experimento. Seta: seleção antes do treinamento; Linhas com círculo: seleção após Tmáx-1; Linhas tracejadas: ratos submetidos à eutanásia para coletas sanguíneas e das glândulas adrenais. Linha pontilhada: ratos submetidos aos testes comportamentais. TR, grupo treinado; C, controle; FOR, "functional overreaching"; NFOR, "nonfunctional overreaching"; D, desempenho (kg.m); RP1/RP2, 2 semanas de recuperação passiva.

2.1.4. Quantificação do desempenho (D). Para determinação do desempenho de cada rato empregou-se modelo massa-dependente previamente definido (15). Tal procedimento considera todas as forças relativas ao PC e as velocidades proporcionais à intensidade de esforço (velocidade de corrida), atingida pelo rato em cada etapa do T_{máx}. Desta maneira, a potência mecânica torna-se proporcional à massa do rato vs. velocidade percorrida em cada etapa (15). O desempenho foi expresso em quilogramas-metros (kg.m), como exemplificado na seguinte equação:

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

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

2.1.5. Grupos experimentais. A partir dos resultados obtidos no T_{máx}-1, de acordo com Hohl et al. (15), os ratos que obtiveram desempenho entre 70 e 230 kg.m ($n = 49$) foram selecionados para participar do PO. Dezesesseis ratos foram utilizados como controle (C) e foram submetidos a um condicionamento leve (1 sessão/d / 2x/semana / 12 m.min⁻¹). Os 33 ratos remanescentes compuseram, inicialmente, grupo treinado (TR) e participaram do PO. Para verificar se o desempenho do rato reduziu (NFOR) ou não (FOR), após o T_{máx}-7, quantificamos o grau de inclinação (α) obtido a partir de uma função linear ($y=ax+b$) por meio da regressão linear dos mínimos quadrados.

Esta regressão matemática foi elaborada a partir dos resultados (D) obtidos nos T_{máx}-3, 4, 5, 6 e 7. O valor de diminuição de desempenho para a separação dos grupos FOR e NFOR foi baseado nos valores de α obtidos no grupo C, que obteve inclinação de $14,38 \pm 15,36$ kg.m. Portanto, o valor de α crítico para distinção dos grupos FOR e NFOR foi estabelecido a partir do valor médio dos indivíduos que compuseram o grupo C menos 1 DP (15), sendo que o α crítico foi - 0,98 kg.m. O resultado deste procedimento pode ser visualizado na Figura 2, onde encontra-se o histograma da distribuição de todos os ratos que realizaram o PO, realizada de acordo com α crítico. Esta distribuição revelou a existência de dois grupos, sendo

que ratos com $\alpha < -0,98$ kg.m foram classificados como NFOR e ratos com $\alpha > -0,98$ kg.m como FOR. Desta maneira, obtivemos os grupos FOR ($n = 19$) e NFOR ($n = 14$). Ato contínuo, 8 ratos de cada grupo experimental (C, FOR e NFOR) foram submetidos à eutanásia logo após o $T_{\text{máx-7}}$, para obtenção de amostras sanguíneas e retirada das glândulas adrenais. O restante foi submetido a duas semanas de recuperação passiva, como descrito anteriormente.

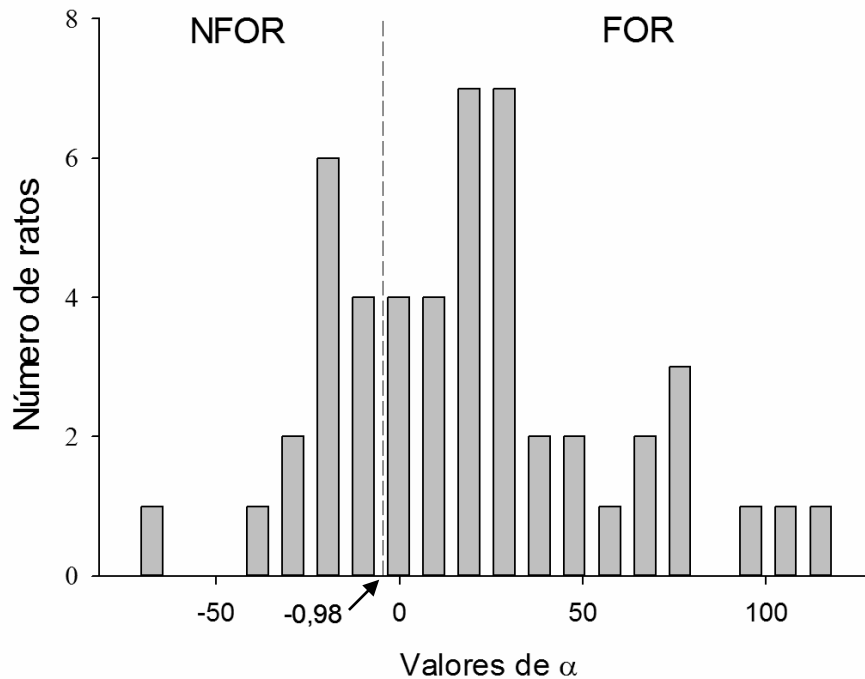


FIGURA 2 - Histograma de distribuição dos grupos; "nonfunctional overreaching" (NFOR, $n = 14$) e "functional overreaching" (FOR, $n = 19$). A seta indica o α crítico de $-0,98$ kg.m utilizado para classificação dos grupos.

2.1.6. Avaliação do período de recuperação. Após o término do PO ($T_{\text{máx-7}}$), os ratos remanescentes dos grupos C, FOR e NFOR foram submetidos a período de recuperação passiva que teve duração de 11 dias. Quantificaram-se PC, consumo de ração e ingestão de água a cada dois dias. Para tanto, 4 ratos foram distribuídos em caixas coletivas, de acordo com os grupos experimentais.

Foram fornecidos 400 g de ração e 500 mL de água, por caixa, sendo estas quantificadas em balança digital e proveta, respectivamente. Os valores de consumo diário para estes itens, foram obtidos calculando-se o total fornecido subtraído

daquilo que restou no dia seguinte, sendo o valor final dividido pelo número de animais de cada caixa.

2.1.7. Testes comportamentais. Para avaliação das possíveis alterações comportamentais foram realizados os testes labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto (CA) na primeira semana de recuperação (RP1). Os ratos foram submetidos ao LCE duas vezes consecutivas, com 1 dia de intervalo entre as medições. Já o CA foi realizado uma única vez. Os testes ocorreram sempre no período das 13:00 às 17:00 h.

Utilizaram-se contadores e cronômetros manuais para mensuração das variáveis avaliadas, que foram quantificadas por um observador que permaneceu numa sala monitorando as atividades de cada rato avaliado, individualmente, por um período de 5 minutos, por meio de uma câmera ligada a uma televisão. Entre um teste e outro, os aparelhos foram limpos com solução hidroalcoólica 5% (v/v), para eliminação dos possíveis sinais odoríferos deixados pelo rato antecessor.

Composto por uma arena circular, com o fundo demarcado em parcelas, durante o CA foram mensuradas as variáveis comportamentais: frequência de locomoção, levantar, autolimpeza corporal ("grooming"), defecação, micção e período de imobilidade (3).

O LCE possui dois braços abertos que são cruzados por dois braços fechados, elevados a 50 cm do chão. Os ratos foram posicionados no centro do aparelho com a cabeça virada para um dos braços fechados. Contabilizaram-se o número de entradas e o tempo de permanência em cada braço. Calcularam-se as porcentagens de entrada e de tempo despendido nos braços abertos conforme mostrado abaixo:

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

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

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

2.1.8. Corticosterona. Para quantificação da corticosterona de repouso ($[cort]_{\text{repouso}}$), as amostras sanguíneas foram obtidas por meio punção da extremidade distal da cauda dos ratos que foi levemente lancetada. Para facilitar tal procedimento, a cauda dos ratos foi previamente imersa em água a 40°C por 30 segundos, para promover a vasodilatação do local. Coletaram-se 200 μL de sangue, depositados em microtubos de 1,5 mL contendo 5 μL de heparina sódica e 3 μL de fluoreto a 1%. Os momentos de coleta foram imediatamente antes do início do PO, do $T_{\text{máx-7}}$ e 9.

Coletas sanguíneas também foram realizadas para avaliação da corticosterona imediatamente após ($[cort]_{\text{após}}$) o $T_{\text{máx-7}}$ e 9. Para tanto, aproximadamente três minutos após os testes, os ratos foram anestesiados via i.p., com uma associação anestésica que continha cetamina, xilazina e acepromazina nas doses de 5.56, 0.55 e 0.11mg.kg⁻¹, respectivamente (36) e o sangue coletado por meio de punção cardíaca. As amostras foram armazenadas em tubos de 4 mL contendo heparina sódica. Todas as amostras sanguíneas foram centrifugadas numa temperatura de 4° C, 10 min a 1900g, sendo o plasma separado em alíquotas em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20°C até o momento das análises.

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

2.1.9. Lactato e glicose. As coletas de sangue para análise das $[lac]$ e $[glic]$ foram realizadas antes e logo após os $T_{\text{máx-2}}$, 6 e 9. Para tanto, todas as amostras foram obtidas pela punção da extremidade distal da cauda, como descrito anteriormente. A quantificação das concentrações de $[lac]_{\text{antes}}$, $[lac]_{\text{após}}$, $[glic]_{\text{antes}}$ e $[glic]_{\text{após}}$ foi realizada pelo método eletro-enzimático em bioanalisador (YSI 2300 STAT PLUS, YSI Incorporated, OH, USA).

2.1.10. Peso relativo das glândulas adrenais. Após o T_{máx}-7 e 9 os ratos foram anestesiados de acordo com o protocolo descrito anteriormente (36) e posicionados em decúbito dorsal. Realizou-se incisão cutânea e subcutânea na linha alba, sendo o peritônio parietal e os órgãos expostos. Em seguida, as glândulas adrenais foram cuidadosamente removidas e pesadas em balança analítica (GR-202-AND company, TO, Japão). O peso relativo das adrenais de cada rato (índice adrenosomático) foi realizado por meio da seguinte relação (27):

$$\frac{\text{Peso das adrenais}}{\text{Peso corpóreo}} \times 100$$

2.1.11. Análise estatística. A análise estatística foi realizada no programa Sigma Plot 12.0. Para comparação do desempenho (D) dos animais intragrupo aplicou-se ANOVA para medidas repetidas no tempo. Para a comparação entre os grupos aplicou-se ANOVA de uma via. Quando necessário aplicou-se o test *post hoc* de Holm-Sidak para comparação das médias. Os testes t de "student" pareado e não pareado foram utilizados quando necessário para comparações intra grupos. Realizou-se correlação de Pearson entre as concentrações de corticosterona e desempenho com o índice adrenosomático. Para todas as análises utilizou-se 5% de probabilidade ($P < 0.05$).

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Desempenho dos grupos nos testes 1 a 9. A partir das três semanas adaptativas, nós obtivemos um percentual de ratos corredores de 75%. Para a confirmação das condições FOR e NFOR em ratos, utilizamos o desempenho (D), obtido a partir de T_{máx}s, sendo que a Tabela 2 revela a comparação intra e entre grupos C, FOR e NFOR. Houve aumento de desempenho para o grupo C a partir do T_{máx}-5 ($P < 0.001$). Os grupos FOR e NFOR aumentaram a sua aptidão física a partir do T_{máx}-2 ($P < 0.001$). NFOR teve redução de desempenho no T_{máx}-7 ($P = 0.001$) que se manteve até o final do período de recuperação.

No T_{máx}-1, não houve diferença entre os grupos ($F = 0.433$; $P = 0.651$). Quando comparado ao grupo C, os grupos FOR e NFOR obtiveram desempenho

maior a partir do T_{máx}-2, ($F = 18.01$, $P < 0.001$; $F = 29.31$, $P < 0.001$; $F = 16.84$, $P < 0.001$; $F = 19.15$, $P < 0.001$ e $F = 24.22$, $P < 0.001$, para os T_{máx}-2, 3, 4 e 5, respectivamente). FOR e NFOR começaram a se diferenciar a partir do T_{máx}-4 ($F = 16.84$; $P < 0.001$), sendo que este comportamento permaneceu até o T_{máx}-8 ($F = 4.436$; $P = 0.024$). No T_{máx}-9 não houve diferença entre os grupos ($F = 1.958$; $P = 0.165$), a despeito do valor de D para o grupo FOR, que foi aproximadamente 36% maior que o grupo NFOR (Figura 3; Figura 1A e 1B).

TABELA 2. Desempenhos dos grupos experimentais.

Desempenho kg.m (D)			
T _{máx}	C (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}
T _{máx} (RC1; RC2)	C (n=8)	FOR (n=11)	NFOR (n=6)
8	230.9 ± 21.3 ^{*ab}	339.1 ± 47.9 ^a	177.4 ± 17.2 ^{∞b}
9	230.6 ± 20.7 ^{*a}	415.5 ± 90.2 ^{*a}	266.7 ± 57.5 ^{∞a}

C = grupo controle;

FOR = grupo "functional overreaching";

NFOR = grupo "nonfunctional overreaching".

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

∞ Indica redução de desempenho em relação ao T_{máx}-6 ($P < 0.05$).

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

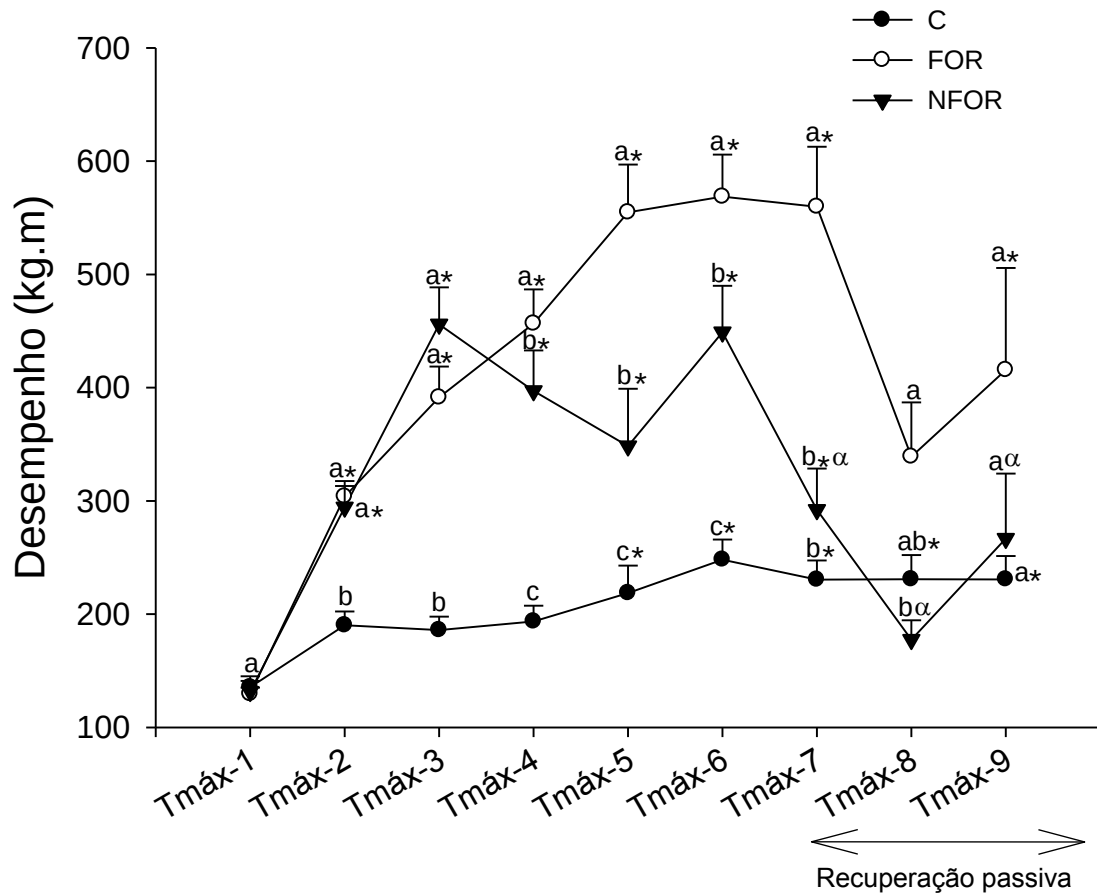


FIGURA 3 - Desempenho dos grupos controle (C), "functional overreaching" (FOR) e "nonfunctional overreaching" (NFOR) nos Tmáxs. De Tmáx-1 a 7: C, $n = 16$; FOR, $n = 19$; NFOR, $n = 14$. Tmáx-8 e 9: C, $n = 8$; FOR, $n = 11$; NFOR, $n = 6$. * Indica aumento de desempenho intragrupo em relação ao Tmáx-1 ($P < 0.05$). α Indica redução de desempenho em relação ao Tmáx-6 ($P < 0.05$). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0.05$).

2.2.2. Peso corpóreo. PC é importante indicador da síndrome de "overtraining", sendo que a pesagem foi realizada imediatamente antes dos Tmáxs e a cada 2 dias no período de recuperação passiva. A partir do Tmáx-3 até o Tmáx-8, houve redução do PC para os grupos FOR e NFOR em relação ao grupo C ($F = 17.09$; $P < 0.001$). No Tmáx-9, correspondente a segunda semana de recuperação passiva (RP2), os PCs dos grupos FOR e NFOR se igualaram ao C ($F = 19.90$; $P = 0.996$; $P = 0.965$, respectivamente) (Figura 4). A Figura 5 revela o PC no período de recuperação. FOR e NFOR tiveram PC menor até o quinto dia ($F = 6.90$; $P < 0.001$), havendo recuperação a partir do sétimo dia ($F = 6.90$; $P = 0.923$ e $P = 0.122$, respectivamente).

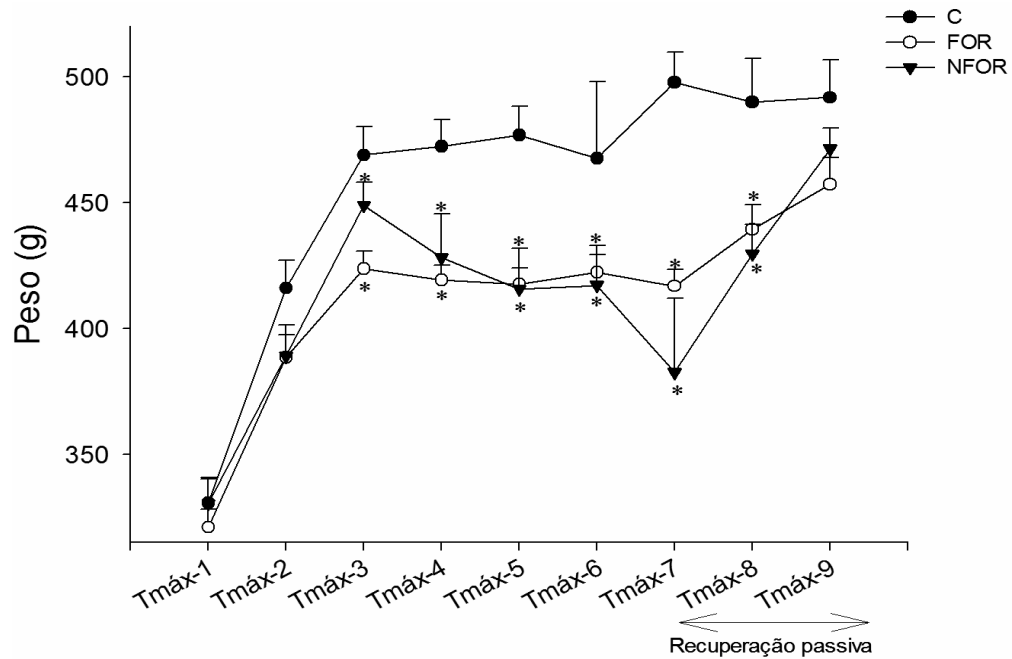


FIGURA 4 - Peso (g) nos testes de esforço máximo. De Tmáx-1 a 7: C, controle ($n = 16$); FOR, "functional overreaching" ($n = 19$); NFOR, "nonfunctional overreaching" ($n = 14$). Tmáx-8 e 9: C, $n = 8$; FOR, $n = 11$; NFOR, $n = 6$. * Indica redução de peso dos grupos FOR e NFOR pelo teste Holm-Sidak ($P < 0.05$). Dados apresentados como Média $\pm$ EPM.

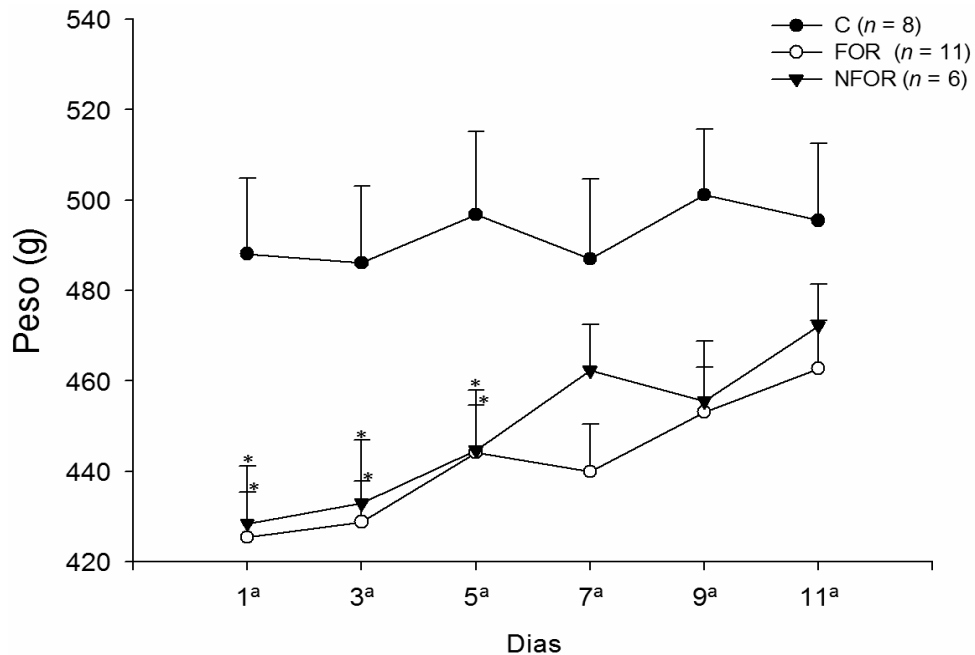


FIGURA 5 - Peso (g) durante 11 dias após o fim do PO. * Indica redução de peso de FOR ("functional overreaching") e NFOR ("nonfunctional overreaching") em relação ao C (Controle) pelo teste Holm-Sidak ($P < 0.05$). Dados apresentados como Média $\pm$ EPM. PO= Protocolo de "overtraining".

2.2.3. Consumo de ração e ingestão de água no período de recuperação.

Realizaram-se controle do consumo de ração e ingestão hídrica (Tabela 3). Houve aumento de consumo médio de ração para o grupo NFOR ($F = 5.74$; $P = 0.004$) em relação aos grupos C e FOR. Não foi observada diferença na média geral para ingestão hídrica ($F = 1.12$; $P = 0.329$). No entanto, houve elevação do consumo de água para os grupos FOR e NFOR no primeiro dia após o final do PO ($P = 0.02$; $P = 0.03$).

TABELA 3. Consumo de ração e água dos grupos no período de recuperação.

Dias	Variáveis					
	Ração (g/dia)			Água (mL/dia)		
	C (n = 8)	FOR (n = 11)	NFOR (n = 6)	C (n = 8)	FOR (n = 11)	NFOR (n = 6)
1	24.9±0.43 ^a	23.0±0.69 ^a	24.7±1.64 ^a	41.2±1.89 ^b	47.7±0.36 ^a	48.3±1.49 ^a
3	30.1±0.43 ^b	27.5±1.07 ^b	36.2±1.27 ^a	44.4±0.71 ^a	38.2±0.84 ^b	39.8±0.67 ^b
5	26.8±0.28 ^c	29.3±0.23 ^a	28.5±0.07 ^b	33.8±2.36 ^a	39.1±1.06 ^a	39.2±0.37 ^a
7	24.8±0.28 ^c	28.6±0.71 ^b	32.0±0.75 ^a	39.4±1.65 ^b	40.0±1.97 ^b	49.2±0.37 ^a
9	27.9±0.33 ^a	28.4±0.65 ^a	28.8±1.71 ^a	50.0±3.78 ^a	43.6±0.89 ^a	48.3±0.75 ^a
11	31.1±0.71 ^b	34.3±0.65 ^a	32.2±0.82 ^{ab}	46.9±2.13 ^b	55.5±1.04 ^a	52.5±0.37 ^a
Média geral ± EPM	27.5±0.39	28.5±0.49	30.3±0.75 [*]	42.6±1.1	44.01±0.8	44.9 ± 0.9

Dados representados por Média ± EPM. C = grupo controle; FOR = grupo "functional overreaching"; NFOR = grupo "nonfunctional overreaching".

Letras diferentes entre colunas significam diferença entre os grupos ($P < 0.05$).

* Indica aumento de consumo de ração do grupo NFOR em relação ao C e FOR ($P < 0.05$).

2.2.4. Efeitos do PO sobre o comportamento. O teste LCE é comumente utilizado para avaliação da comportamento ansiolítico ou ansiogênico. O teste CA permite avaliar a emocionalidade de ratos em ambientes não familiares com ênfase na atividade locomotora. No LCE não houve diferença entre os grupos na porcentagem de entradas e nem no tempo de permanência no braço aberto em nenhum dos dois testes realizados (1º teste: $F = 2.65$, $P = 0.093$; $F = 1.38$, $P = 0.271$; 2º teste: $F = 1.46$, $P = 0.252$; $F = 1.39$, $P = 0.269$, respectivamente) (Figura 6).

No teste CA, os grupos FOR e NFOR tiveram frequência de levantar maior ($F = 3.95$; $P = 0.034$) em relação ao grupo C. Para variável locomoção, a despeito da ausência de diferença estatística entre os grupos, houve um aumento percentual da

locomoção para os grupos FOR e NFOR de aproximadamente 30% em relação ao C ($F = 3.03$; $P = 0.069$). Não houve diferença entre os grupos para as variáveis "grooming" ($F = 1.59$; $P = 0.226$), tempo imóvel ($F = 1.15$; $P = 0.333$), fezes ($F = 1.83$; $P = 0.183$) e urina ($F = 0.34$; $P = 0.711$) (Figura 7).

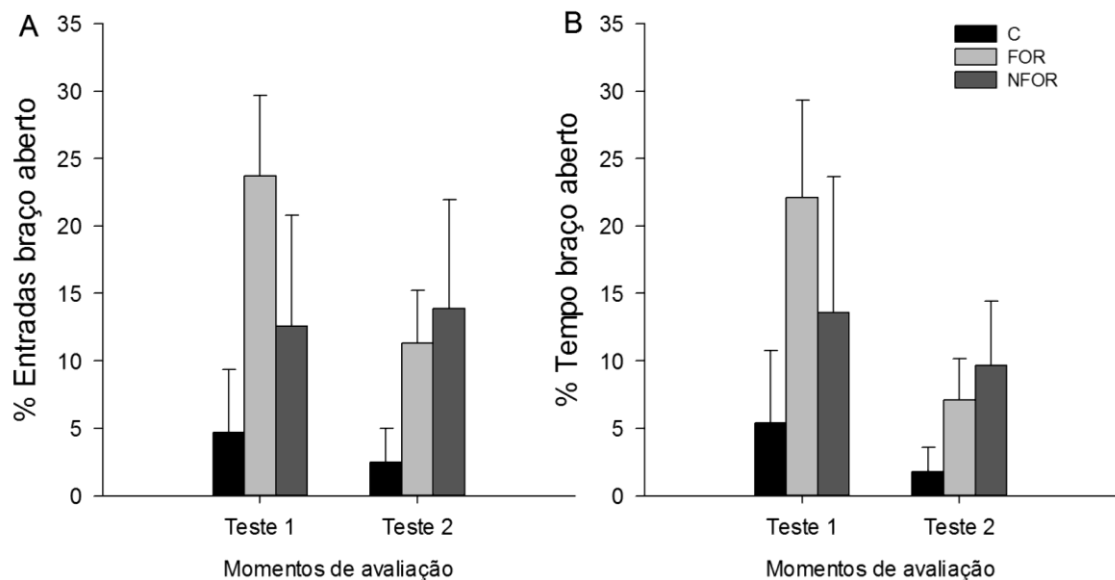


FIGURA 6 - Porcentagem de entradas do braço aberto (A) e porcentagem de tempo de permanência no braço aberto (B) ($P < 0.05$). C = controle ($n = 8$); FOR = "functional overreaching" ($n = 11$); NFOR = "nonfunctional overreaching" ($n = 6$). Dados apresentados como Média $\pm$ EPM.

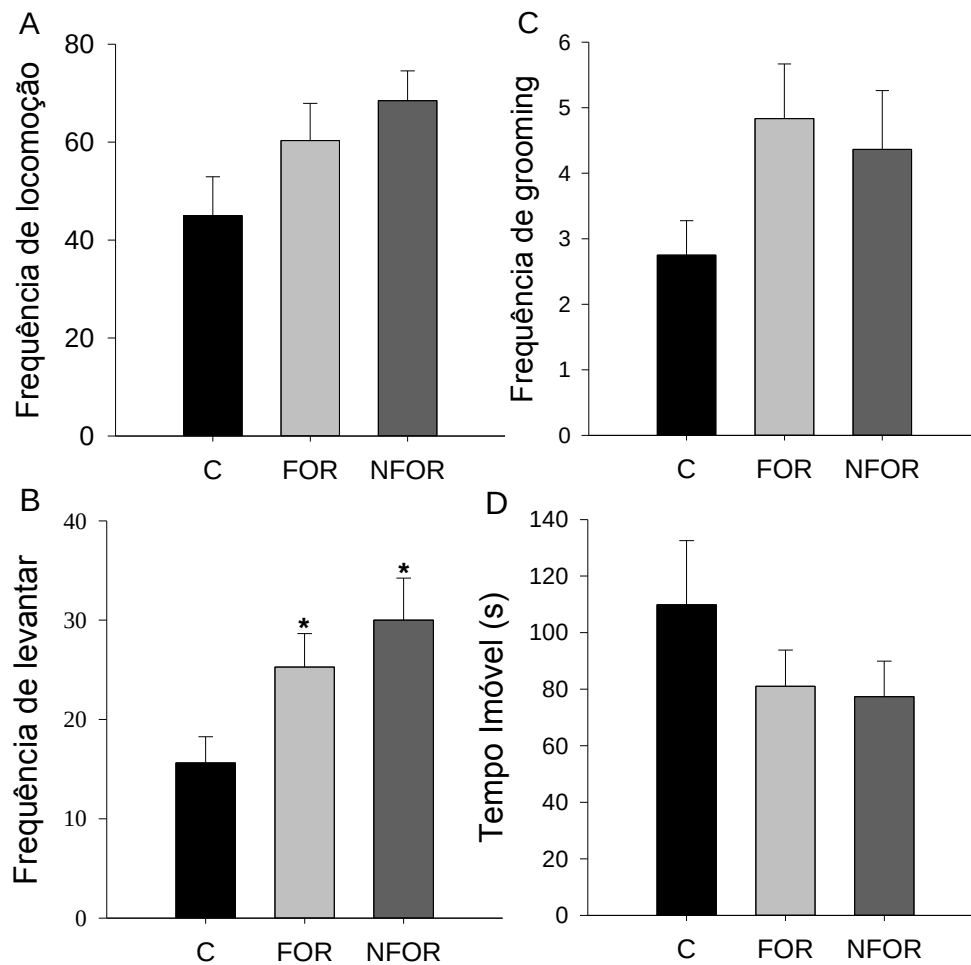


FIGURA 7 - Frequência de locomoção (A); Frequência de levantar (B); Frequência de "grooming" (C); Tempo imóvel (D). Dados apresentados como Média $\pm$ EPM. * Indica aumento da frequência de levantar em relação ao grupo C ($P < 0.05$). C = controle ($n = 8$); FOR = "functional overreaching" ($n = 11$); NFOR = "nonfunctional overreaching" ($n = 6$).

2.2.5. Corticosterona. As avaliações das [cort]s são utilizadas como indicador de alterações no eixo HHA. A Figura 8A revela que houve aumento da [cort]_{repouso} para o grupo C em relação ao momento imediatamente antes do início do treinamento ($F = 2.13$; $P = 0.0368$). Não houve diferença entre os grupos imediatamente após os T_{máx} (T_{máx}-7 e 9) ($F = 1.88$; $P = 0.0979$; Figura 8B).

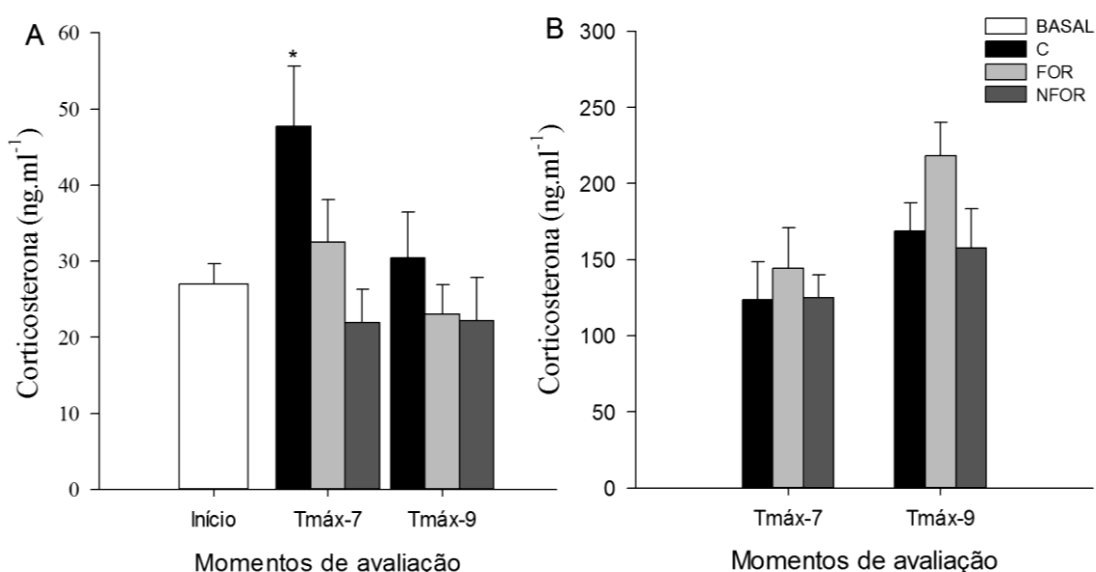


FIGURA 8 - Concentrações de corticosterona de repouso (A). Concentrações de corticosterona após o Tmáx-7 e 9 (B). C = controle; FOR = "functional overreaching"; NFOR = "nonfunctional overreaching". Em Tmáx-7: C, $n = 8$; FOR, $n = 8$; NFOR, $n = 8$. Em Tmáx-9: C, $n = 8$; FOR, $n = 11$; NFOR, $n = 6$. * Indica aumento em relação ao momento imediatamente antes do início do PO ($P < 0.05$). Dados apresentados como Média $\pm$ EPM. PO= Protocolo de "overtraining".

2.2.6. Lactato e glicose. A lactatemia é considerada um bom indicador de esforço anaeróbio e da aptidão física. A Tabela 4 revela os resultados das concentrações de lactato e glicose intra e entre grupos (C, FOR e NFOR) nos momento antes e após Tmáx-2, 6 e 9.

No Tmáx-2 e 6 houve aumento da $[lac]_{antes}$ para o grupo C. Houve elevação para todos os grupos na $[glic]_{após}$ em Tmáx-2, 6 e 9 ($P < 0.001$), exceto para o grupo FOR no Tmáx-9, que não apresentou diferença $[glic]_{antes}$ e $[glic]_{após}$ ($P = 0.117$).

Houve redução no grupo FOR na $[lac]_{após}$ em relação ao grupo C no Tmáx-2. No Tmáx-6 houve aumento da $[lac]_{antes}$ e redução $[lac]_{após}$ para os grupos FOR e NFOR em relação ao C, sendo que NFOR apresentou valores $[lac]_{após}$ maiores que o grupo FOR. No Tmáx-9 não houve diferença em nenhum momento. No Tmáx-2 e 9 não houve diferença em nenhum momento entre os grupos nas concentrações de glicose. No Tmáx-6 houve redução dos valores $[glic]_{antes}$ para FOR e NFOR em relação ao C, e redução na $[glic]_{após}$ para FOR em relação ao C.

Com relação ao $[\text{lac}]_{\text{antes}}$ e $[\text{glic}]_{\text{antes}}$ intragrupo, para o grupo C houve aumento da lactatemia ao longo dos Tmáxs ($P < 0.001$) e glicemia no Tmáx-2 em relação ao 6 ($P = 0.004$). O grupo FOR obteve menor lactatemia no Tmáx-2 em comparação com 6 e 9 ($P < 0.001$; $P = 0.004$) e glicemia no Tmáx-6 em relação ao 2 e 9 ($P < 0.001$ para ambos). O grupo NFOR obteve maior lactatemia no Tmáx-6 em comparação ao 2 ($P < 0.001$) e glicemia no Tmáx-2 em relação ao 6 ($P < 0.001$).

Já nas comparações intragrupo para $[\text{lac}]_{\text{após}}$ e $[\text{glic}]_{\text{após}}$, no grupo C houve aumento da lactatemia no Tmáx-6 em relação ao 2 e 9 ($P = 0.001$; $P = 0.003$) e glicemia no Tmáx-6 em relação ao 2 ($P = 0.02$). O grupo FOR não mostrou diferença em relação a lactatemia e glicemia ($P = 0.168$; $P = 0.335$). O grupo NFOR também não obteve diferença na lactatemia ($P < 0.155$) apresentando maior glicemia no Tmáx-6 em relação ao 2 ($P = 0.001$). Mesmo não havendo diferença estatística entre os grupos FOR e NFOR no momento Tmáx-6 na $[\text{lac}]_{\text{após}}$, numericamente houve aumento de 56% e 14% para os grupos C e NFOR, respectivamente, enquanto o grupo FOR apresentou um decréscimo de 22%.

O grupo FOR obteve delta do lactato menor nos Tmáx-2 e 6 em relação ao grupo C enquanto que o NFOR obteve delta menor apenas no Tmáx-6 em relação ao C. Não houve diferença entre os grupos em nenhum momento no delta da glicose (Tabela 4; Figura 3A).

TABELA 4. Resultados das concentrações de lactato e glicose durante os Tmáx-2, 6 e 9.

Variáveis	Grupos	Momentos de Avaliação								
		Tmax-2			Tmax-6			Tmax-9		
		Antes	Após	Δ	Antes	Após	Δ	Antes	Após	Δ
Lactato (mmol/L)	C	2.12±0.12 ^c	5.10±0.43 ^{B#}	2.98±0.46	3.38±0.26 ^b	7.64±0.43 ^{A#}	4.26±0.57	4.66±0.48 ^a	5.92±0.93 ^B	1.26±1.2
	FOR	2.55±0.13 ^b	3.32±0.36 ^{A*}	0.77±0.41 [*]	4.58±0.34 ^{a†}	3.61±0.38 ^{A*}	-0.97±0.47 [*]	4.04±0.50 ^a	4.34±0.38 ^A	0.3±0.51
	NFOR	2.53±0.25 ^b	3.82±0.63 ^A	1.29±0.71 [*]	4.68±0.40 ^{a†}	5.43±0.63 ^{A*£}	0.75±0.8 [*]	4.04±0.84 ^{ab}	4.76±0.81 ^A	0.72±0.65
	F	2.01	3.95	5.05	4.37	19.38	20.38	0,69	1.55	0.385
	P	0.14	0.026	0.01	0.018	<0.001	<0.001	0.696	0.234	0.685
Glicose (mmol/L)	C	4.54±0.11 ^a	5.61±0.17 ^{B#}	1.07±0.16	3.96±0.10 ^b	6.52±0.21 ^{A #}	2.56±0.22	4.10±0.10 ^{ab}	6.13±0.42 ^{AB #}	2.03±0.45
	FOR	4.59±0.07 ^a	5.32±0.12 ^{A#}	0.73±0.13	3.53±0.06 ^{b*}	5.66±0.17 ^{A#*}	2.13±0.16	4.60±0.25 ^a	5.29±0.20 ^A	0.69±0.40
	NFOR	4.42±0.16 ^a	5.11±0.16 ^{B#}	0.69±0.21	3.56±0.07 ^{b*}	6.19±0.24 ^{A #}	2.63±0.22	4.12±0.07 ^{ab}	5.37±0.36 ^{AB #}	1.25±0.30
	F	0.531	2.44	1.518	8.12	4.68	1.89	1.99	2.10	2.83
	P	0.592	0.098	0.230	<0.001	0.014	0.162	0.15	0.14	0.08

C = controle; FOR = "functional overreaching"; NFOR = "nonfunctional overreaching". Em Tmáx-2 e 6: C, $n = 16$; FOR, $n = 19$; NFOR, $n = 14$. Em Tmáx-9: C, $n = 8$; FOR, $n = 11$; NFOR, $n = 6$. *Indica redução em relação ao grupo C pelo teste Holm-Sidak. † Indica aumento em relação ao grupo C pelo teste Holm-Sidak. £ Indica que NFOR foi maior que FOR pelo teste Holm-Sidak. # Indica aumento em relação aos valores basais pelo teste t de "student" pareado. Letras minúscula diferentes entre linhas indicam diferença nos momentos antes intragrupo. Letras maiúsculas entre linhas indicam diferença nos momentos após intragrupo.

2.2.7. Peso relativo das adrenais. O peso relativo das adrenais é um dos métodos utilizados para avaliar resposta estressante em ratos submetidos a protocolo de atividade física. A Figura 9 revela os pesos relativos das glândulas adrenais nos momentos Tmáx-7 e 9.

Houve aumento no grupo NFOR no Tmáx-7 em relação ao C ($F = 3.574$; $P = 0.046$). No Tmáx-9 não há diferença entre os grupos ($F = 0.291$; $P = 0.750$). Quando comparadas as duas coletas, houve diminuição do índice adrenossomático do grupo NFOR no Tmáx-9 em relação a ele mesmo no Tmáx-7 ($F = 3.779$; $P = 0.006$). Não houve correlação entre os índices adrenossomáticos e as concentrações de corticosterona ($P = 0.473$). Houve correlação entre o desempenho do grupo NFOR no Tmáx-7 com o índice adrenossomático deste grupo neste momento ($P = 0.03$; $R = -0,754$), demonstrando que o índice adrenossomático aumentou de acordo com a queda em seu desempenho. O mesmo comportamento foi observado para NFOR no Tmáx-9, onde houve aumento de desempenho acompanhado por redução do índice adrenossomático ($P = 0.004$; $R = 0,94$).

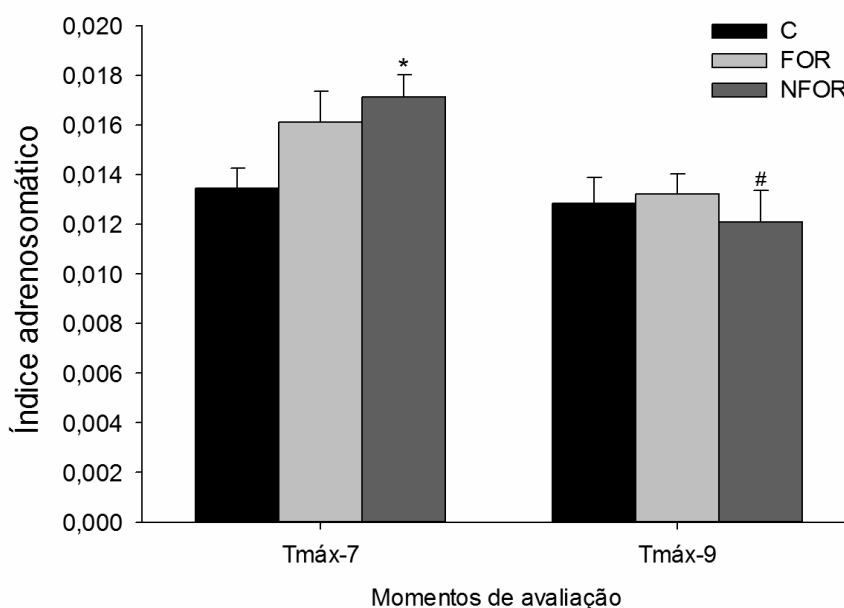


FIGURA 9 - Índice adrenossomático. C = controle; FOR = "functional overreaching"; NFOR = "nonfunctional overreaching". Em Tmáx-7: C, $n = 8$; FOR, $n = 8$; NFOR, $n = 8$. Em Tmáx-9: C, $n = 8$; FOR, $n = 11$; NFOR, $n = 6$. *Indica aumento em relação ao grupo C no Tmáx-7 pelo teste Holm-Sidak ($P < 0.05$). # Indica diminuição do grupo NFOR no Tmáx-9 em relação a ele mesmo no Tmáx-7 pelo teste Holm-Sidak ($P < 0.05$). Dados apresentados como Média $\pm$ EPM.

2.3. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a submeter ratos Wistar a um protocolo de "overtraining" (PO) previamente determinado (15) e avaliar a influência sobre o comportamento e variáveis bioquímicas, incluindo o hormônio corticosterona, lactato e a glicose, sendo que as variáveis de comportamento e lactato são inéditas para ratos FOR e NFOR. Os principais achados comprovaram a reprodutibilidade do protocolo desenvolvido por Hohl et al. (15), que provocou em ratos submetidos a intensidades incrementais, as condições de FOR e NFOR. Podemos propor que tal metodologia induziu em ambos os grupos ansiedade e diminuição nas $[lac]_{máximas}$ e aumento do índice adrenosomático no grupo NFOR.

Até o momento a única variável estabelecida na literatura que está relacionada com as condições NFOR/SOT é a redução da aptidão física (23). 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 física. A redução persistente da performance observada na condição NFOR foi notória, sendo que os valores de desempenho não retornaram aos anteriormente atingidos nos $T_{máx}$ s ($T_{máx}$ -3, 4, 5 e 6). Esta redução se manteve no período de recuperação passiva ($T_{máx}$ -8 e 9). Este achado corroborou os resultados encontrados em estudos previamente realizados em ratos e camundongos (15,29), que revelaram redução persistente do desempenho no grupo NFOR. Ademais, a aptidão física do grupo C, na comparação intra-grupo, melhorou de maneira tênue. Este resultado pode ser explicado a partir da comparação entre os delineamentos experimentais de outros estudos. Todos os ratos tiveram maior período de adaptação, ou seja, uma semana a mais em relação ao protocolo de Hohl et al. (15) e duas semanas a mais em relação ao utilizado por Pereira et al. (29). Ademais, acrescentamos uma semana de treino na última fase do PO (F5). Essas modificações realizadas contribuíram tanto para ocorrência da adaptação moderada dos ratos que praticaram exercício leve como para percentual alto (75%) de ratos corredores obtidos no início do experimento.

Outra variável importante nas condições NFOR/SOT é o PC, sendo que reduções são apontadas como um dos sintomas destas condições em atletas humanos (34). Durante o PO, os grupos FOR e NFOR apresentaram PCs menores em relação ao grupo C, que permaneceram até o T_{máx}-8. Ambos recuperaram seus PCs no sétimo dia da recuperação passiva. Os PCs de FOR e NFOR não diferiram. Portanto, este resultado sugeriu que a redução do PC com o aumento da intensidade e do volume das cargas de treinamento impostas pelo protocolo (15). Hohl et al. (15) também mostraram redução do PC em ambos os grupos, obtendo recuperação desta variável em uma semana para o grupo FOR e duas semanas para o grupo NFOR. Estes autores relacionaram esta redução com o possível hipermetabolismo e proteólise promovidos pela intensificação do exercício.

Houve maior consumo de ração para o grupo NFOR na semana de recuperação passiva, achado que pode estar relacionado com a maior demanda energética provocada pelas sessões de exercício (29). Similarmente, Pereira et al. (29) revelaram aumento na ingestão alimentar do grupo OT durante o protocolo de treinamento. Já o aumento da ingestão hídrica, no primeiro dia após o final do PO, para ambos os grupos, pode ter ocorrido devido ao aumento da perda de água pela via respiratória (22). Durante o treinamento, a reposição natural de líquido pode ter ocorrido inadequadamente, ocorrendo aumento da sede.

O LCE e o CA são testes utilizados para avaliação da ansiedade e da atividade exploratória em roedores. Uma droga ansiolítica, como o diazepam, pode ser utilizada para validar tais testes com intuito de avaliar a ansiedade (39). Neste contexto, o efeito de uma substância ansiolítica, aumenta a frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos no LCE (10) e reduz a atividade locomotora no CA. Estas respostas indicam redução da ansiedade (16). No presente estudo não foram observadas diferenças no LCE. Pesquisas com atividade física e comportamento relataram que roedores submetidos a exercícios em altas intensidades apresentaram menor percentual de entradas nos braços abertos. Este efeito pode ser considerado um efeito ansiogênico (9), sendo que ratos com aptidão física para realizarem exercício de resistência exibiram maior comportamento de ansiedade no LCE (38). No CA, o aumento da atividade locomotora é comumente atribuído a efeitos ansiogênicos (9). No entanto, levando em consideração as

circunstâncias que o rato é exposto, este aumento pode ser indicativo de pânico e ansiedade, já que a locomoção é reduzida por fármacos agonistas GABAérgicos, como o diazepam e aumentada por seus antagonistas (9). Em relação aos resultados obtidos nos testes comportamentais, é importante que se leve em conta também a individualidade biológica de cada animal, o que pode gerar respostas comportamentais e adaptativas diferentes frente ao protocolo que foram submetidos. Os resultados referentes ao CA revelaram aumento da atividade locomotora geral e exploratória para os grupos FOR e NFOR, observadas por meio do aumento das frequências de locomoção e levantar. Esse resultado revela efeito ansiogênico, sendo este um dos sintomas relacionados às condições NFOR/SOT em humanos (27). Neste sentido, até os indivíduos FOR apresentaram certo grau de ansiedade. O fato do grupo NFOR ter ingestão de ração maior em relação aos demais grupos pode contribuir para a confirmação do desencadeamento da ansiedade neste grupo, levando em consideração que aumento do consumo alimentar é um dos sintomas observados nesta psicopatologia. Este achado evidencia a necessidade de mais pesquisas que busquem esclarecer as prováveis vias neuronais relacionadas ao desencadeamento dessas alterações comportamentais, como as gabaérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas, para que, futuramente, seja possível utilizar esses estudos nos protocolos terapêuticos das psicopatias desenvolvidas pelos atletas de alto rendimento.

Do ponto de vista endócrino, não houve alteração nas variáveis $[cort]_{\text{repouso}}$ nem $[cort]_{\text{após}}$ para os grupos FOR e NFOR. Grande parte de pesquisas com humanos concluiu que tanto exercícios de alta intensidade quanto os de resistência causam aumento de ACTH e cortisol plasmáticos (12). Estudos com roedores relataram redução de desempenho acompanhado de aumento das concentrações de corticosterona em indivíduos do grupo NFOR (21), aumento da corticosterona durante natação em diferentes intensidades (6) bem como redução em todos os roedores que praticaram atividade física, incluindo o grupo OT (28). É importante ressaltar que nem sempre são observados aumentos nas concentrações deste glicocorticóide na SOT (14) e que os resultados descritos na literatura são bastante controversos. Um estudo com corrida voluntária em roedores detectou elevações nas concentrações de corticosterona de repouso durante a primeira semana após os

animais serem submetidos a atividade física, sendo que houve normalização destes valores após 4 ou 8 semanas de treino (4). Deste modo, este resultado pode ser uma explicação para a não diferença entre os grupos FOR e NFOR nos momentos de repouso em nosso trabalho, revelando que a $[cort]_{repouso}$ pode ter sido alterada durante o PO, no entanto possivelmente seus valores se normalizaram após algumas semanas de treino. Suportando esta hipótese, outro estudo com ratos revelou que a análise das concentrações deste hormônio não diferiu entre os grupos treinados (19).

A dinâmica das $[lac]$ s são relacionadas com a aptidão física dos atletas. Desta maneira, este metabólito pode ser usado como um marcador bioquímico do "overtraining" (23). Houve redução da $[lac]_{após}$ no momento $T_{máx-2}$ para grupo FOR e no $T_{máx-6}$ para ambos os grupos (FOR e NFOR). Especula-se que esta redução da lactatemia no grupo NFOR pode estar relacionada a reduções nas concentrações de glicogênio muscular, na produção e na ação das catecolaminas sobre as fibras musculares (12). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Meeusen et al. (24) que encontraram que de maneira geral, atletas humanos de resistência que apresentam SOT, redução da concentração máxima de lactato.

Os resultados das concentrações de glicose revelaram que no $T_{máx-2}$ e 9 não houve diferença em nenhum momento entre os grupos. No $T_{máx-6}$ houve redução das concentrações na $[glic]_{antes}$ para FOR e NFOR em relação ao C, e para FOR na $[glic]_{após}$. Em todos os momentos houve aumento da $[glic]_{após}$ em relação a $[glic]_{antes}$ para todos os grupos, exceto para o grupo FOR no $T_{máx-9}$. Estudo com ratos submetidos a treinamento moderado mostrou redução da glicemia quando comparado aos grupos controle e sedentário (19). Confirmando nossos resultados, em modelo de exercício físico anaeróbio utilizando sessão aguda de esforço, foram observados aumentos nas concentrações séricas de glicose (30). Os autores apontaram que esta resposta pode estar relacionada com o aumento da atividade simpática com consequente aumento da atividade glicogenolítica muscular e hepática (31). Uma possível depleção de glicogênio pode ter sido causada pelo protocolo ao qual os animais foram submetidos, tem sido proposto na literatura que à medida que o nível de glicogênio muscular diminui, pode ocorrer sinalização para o fígado para aumentar a sua produção de glicose com intuito de evitar uma redução

na concentração de glicose induzida pelo exercício (13). Portanto, o aumento da glicose observada nos grupos pode estar relacionado a estimulação do fígado devido a redução das reservas de glicogênio.

Com relação ao índice adrenosomático, encontramos aumentos para o grupo NFOR no T_{máx}-7 seguido por uma diminuição no T_{máx}-9, que corresponde ao período após duas semanas de recuperação passiva. Este achado pode ser um indicador de NFOR durante o treinamento em roedores, já que está correlacionado ao desempenho, sendo que no momento T_{máx}-7 houve redução da aptidão física acompanhada pelo aumento do peso das adrenais, e a correlação inversa ocorreu no T_{máx}-9, onde o aumento do desempenho foi acompanhado pela redução no índice adrenosomático. Dando respaldo aos nossos resultados, Lanza et al. (19) mostraram no grupo de ratos treinados em esteira uma tendência para um maior peso relativo da adrenal e Moraska et al. (26) demonstraram que a corrida em esteira também resultou hipertrofia adrenal, resultado associado a adaptações potencialmente negativas do exercício. A hipertrofia adrenal faz parte de alterações fisiopatológicas comuns produzidas pelo estresse crônico, sendo que esta alteração ocorre devido à estimulação por um longo período do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (26). Possivelmente, a hipertrofia das glândulas adrenais ocorre pois a exposição repetida ao estressor (exercício) causa a ativação crônica do eixo HHA que irá estimular a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este estímulo crônico da glândula adrenal pela ACTH imposto pelo exercício resultará em proliferação de células corticais adrenais causando a hipertrofia (26). A hipertrofia da adrenal também está relacionada a "síndrome do estresse" proposta por Selye em 1936 (32), o que indica que possivelmente este seja um sintoma que corrobora com o desenvolvimento da ansiedade demonstrada no teste de CA.

2.4. CONCLUSÕES

O protocolo de "overtraining" utilizado no presente trabalho induziu nos ratos as condições FOR e NFOR, que desencadearam comportamento ansioso bem como alterações nas concentrações de lactato e glicose. Houve aumento do índice adrenosomático no grupo NFOR.

2.5. IMPLICAÇÕES FUTURAS

Sugere-se que novos estudos devem ser conduzidos sobre as alterações comportamentais e os possíveis eixos neuronais relacionados a essas, como gabaérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos com a finalidade de se encontrar um possível tratamento para a sintomatologia psicológica da SOT.

2.6. REFERÊNCIAS

1. Aubry A, Hausswirth C, Louis J, Coutts AJ, Buchheit M, Le Meur Y. The development of functional overreaching is associated with a faster heart rate recovery in endurance athletes. *PloSone*. 2015;10(10):1-16.
2. Bosquet L, Leger L, Legros P. Blood Lactate Response to overtraining in male athletes. *Eur J ApplPhysiol*. 2001;84(1-2):107-114.
3. Broadhurst, P. L. Experiments in psychogenetics. In: EISENK, H. J. Experiments in personality. 1960. p.31-71.
4. Campbell, J. E., Rakhshani, N., Fediuc, S., Bruni, S., & Riddell, M. C. Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *J Appl Physiol*. 2009;106(1):66-72.
5. Carfagno, D. G., & Hendrix, J. C. Overtraining syndrome in the athlete: current clinical practice. *Curr Sports Med Rep*. 2014;13(1):45-51.
6. Contarteze RVL, Manchado FDB, Gobatto, CA, Mello MARD. Biomarkers of stress in rats exercised in swimming at intensities equal and superior to the maximal estable lactate phase. *Rev Bras Med Esporte*. 2007;13(3):169-74.
7. Coutts A, Reaburn P, Piva TJ, Murphy A. Changes in selected biochemical, muscular strength, power, and endurance measures during deliberate overreaching and tapering in rugby league players. *Int J Sports Med*. 2007;28(2):116-24.
8. Da Cruz, J. G. P., Del Magro, D. D., Fistarol, A. C., Ferreira, F. Effects of swimming exercise on anxiety in young and adult mice. *J Biol and Med Scienc*, 2010; 9(2): 93-96.
9. Dishman, R. K., Dunn, A. L., Youngstedt, S. D., Davis, J. M., Burgess, M. L., Wilson, S. P., & Wilso, M. A. Increased open field locomotion and decreased striatal GABA A binding after activity wheel running. *Physiol. Behav*. 1996;60(3):699-705.
10. Doukkali, Z., Taghzouti, K., Boudida, E. L. H. Small Nettle: Evaluation of Its Anxiolytic Effect in the Elevated Plus-Maze and Open Field. *Ann Clin Lab Res*. 2016;4:1.

11. Graaf-Roelfsema E, Keizer HA, Van Breda E, Wijnberg ID, Van Der Kolk JH. Hormonal responses to acute exercise, training and overtraining a review with emphasis on the horse. *Vet Quart.* 2007;29(3):82-101.
12. Gleeson, M. Biochemical and immunological markers of overtraining. *J Sports Sci Med.* 2002;1(2):31-41.
13. Gholamnezhad, Z., Boskabady, M. H., Hossein, M., et al (2014). Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(1):1-8.
14. Halson S, Jeukendrup A. Does *overtraining* exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med.* 2004;34(14):967-981.
15. Hohl R, Ferraresso RL, De Oliveira RB, Lucco R, Brenzikofer R, De Macedo DV. Development and characterization of an overtraining animal model. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(5):1155-63.
16. Hossain, M. F., Talukder, B., Rana, M. N., et al. In vivo sedative activity of methanolic extract of *Sterculia villosa* Roxb. leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2016;16(1):398.
17. Kellmann, M. (2010). Preventing overtraining in athletes in high-intensity sports and stress/recovery monitoring. *Scand J Med Sci.* 2010;20(s2):95-102.
18. Kreher JB, Schwartz B. Overtraining syndrome a practical guide. *Sports Health.* 2012; 4(2):128-38.
19. Lanza, J. F., Sanchez-Roige, S., Gagliano, H., Fuentes, S., Bayod, S., Camins, A., Escorihuela, R. M. (2012). Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(11):1745-1754.
20. Lehmann M, Schnee W, Scheu R, Stockhausen W, Bachl N. Decreased nocturnal catecholamine excretion: parameter for an overtraining syndrome in athletes? *Int J Sports Med.* 1992;13(3):236-242.
21. Lira FS, Rosa, JC, Pimentel, GD et al. Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. *Lipids Health Dis.* 2010; 9(1):1.
22. Machado-Moreira, C. A., Vimieiro-Gomes, A. C., Silami-Garcia, E., et al. Exercise fluid replacement: is thirst enough?. *Rev Bras Med Esporte.* 2006;12(6):405-409.

23. Meeusen R, Duclos M, Foster C, et al. 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. *Med Sci Sports Exerc.* 2013;45(1):186-205.
24. Meeusen, R., Nederhof, E., Buyse, L., Roelands, B., De Schutter, G., & Piacentini, M. F. Diagnosing overtraining in athletes using the two-bout exercise protocol. *Br J Sports Med.* 2010;44(9):642-648.
25. Meeusen, R., Piacentini, M. F., Busschaert, B., et al. Hormonal responses in athletes: the use of a two bout exercise protocol to detect subtle differences in (over) training status. *Eur J Appl Physiol.* 2004; 91(2-3): 140-146.
26. Moraska, A., Deak, T., Spencer, R. L., et al. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(4):1321-1329.
27. Myrick, K. M. Overtraining and Overreaching Syndrome in Athletes. *J. Nurse Pract.* 2015;11(10):1018-1022.
28. Ogonovszky H, Sasvári M, Dosek A, Berkes I, et al. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Can J Appl Physiol.* 2005;30(2):186-95.
29. Pereira BC, Luis Filho AL, Alves GF, et al. A new overtraining protocol for mice based on downhill running sessions. *Clin Exp Pharmacol P.* 2012;39(90):793-98.
30. Rodrigues MD, Borin SH, da Silva CA. Metabolic relations in rats under the ladder in anaerobic. *Br J Sport Sciences.* 2016;38(1):1-5.
31. Rogatto GP, Faria MC, Luciano E. Respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos. *Rev bras ativ fís saúde.* 2001;6(2):39-46.
32. Selye, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 1936;138(3479):32.
33. Shearer DA, Sparkes W, Northeast J, Cunningham DJ, Cook C J, Kilduff L P. Measuring recovery: An adapted Brief Assessment of Mood (BAM+) compared to biochemical and power output alterations. *J Sci Med Sport.* 2016.
34. Solomon ML, Kelly AKW. Approach to the Underperforming Athlete. *Pediatr Ann,* 2016;45(3):91-96.

35. Souza, R. W. A., Aguiar, A. F., Vechetti-Júnior, I. J., et al. Resistance Training With Excessive Training Load and Insufficient Recovery Alters Skeletal Muscle Mass–Related Protein Expression. *J Strength Cond Res*. 2014; 28(8): 2338-2345.
36. Steiner AA, Dogan MD, Ivanov AI. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. *Faseb J*. 2004;18(15):1949-51.
37. Urhausen A, Kindermann W. Diagnosis of overtraining. *Sports Med*. 2002;32(2):95-102.
38. Waters, R. P., Renner, K. J., Summers, C. H., et al. Swallow, J. G. Selection for intrinsic endurance modifies endocrine stress responsiveness. *Behav. Brain Res*. 2010;1357:3-61.
39. Wormald, D., Lawrence, A. J., Carter, G., Fisher, A. D. Validation of modified open field behaviour as a measure of trait anxiety in the dog. *Appl Anim Behav Sci*. 2016;179:95-102.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

APÊNDICE

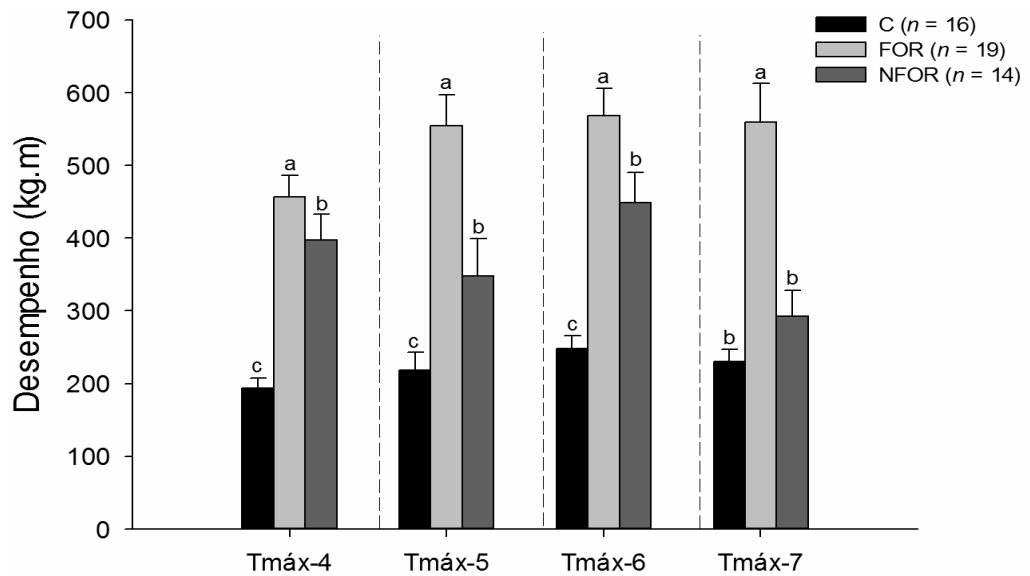
Henriette Gellert Moranza

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

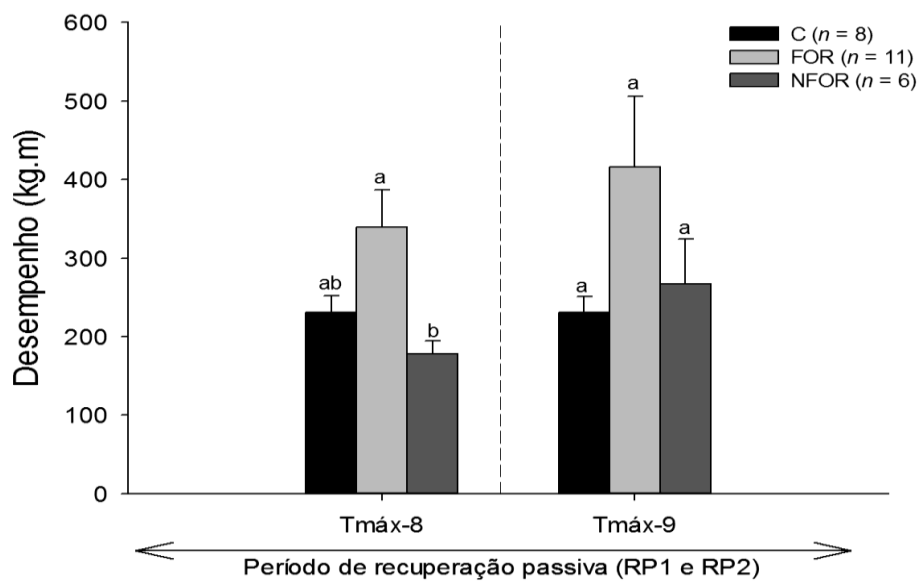
Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia

2017

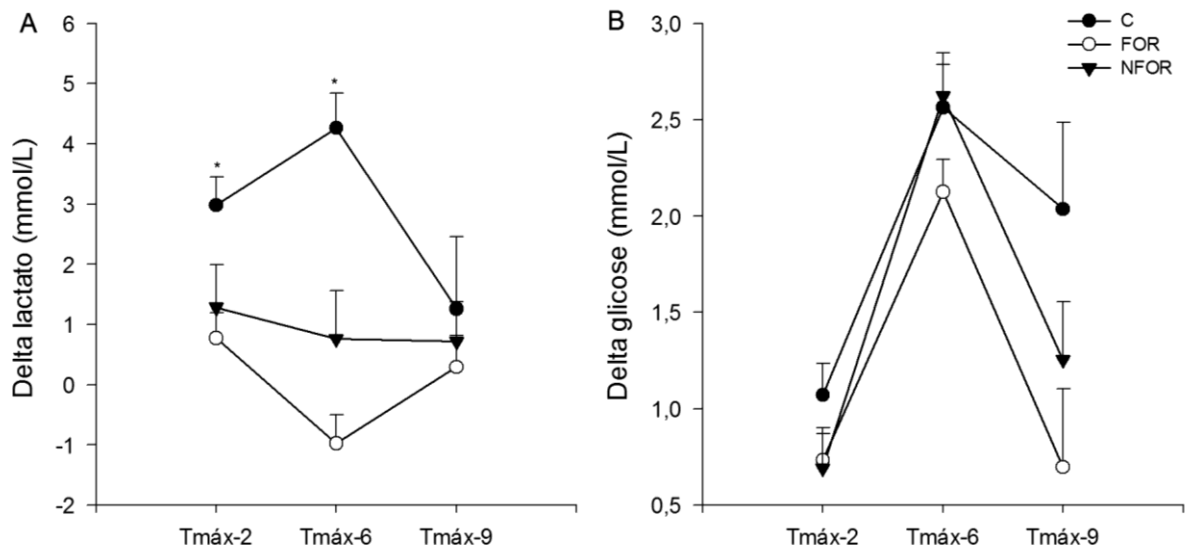
3. APÊNDICE A



1A - Desempenho dos grupos controle (C), "functional overreaching" (FOR) e "nonfunctional overreaching" (NFOR) no Tmáx-4, 5, 6 e 7. Resultados apresentados como Média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos ($P < 0.05$).



2A - Desempenho dos grupos controle (C), "functional overreaching" (FOR) e "nonfunctional overreaching" (NFOR) nos Tmáx-8 e 9. RP1 e RP2 = recuperação passiva. Resultados apresentados como Média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos no período de recuperação passiva pós PO ($P < 0.05$). PO = Protocolo de "overtraining".



3A - C = controle; FOR = "functional overreaching"; NFOR = "nonfunctional overreaching". Em Tmáx-2 e 6: C, $n = 16$; FOR, $n = 19$; NFOR, $n = 14$. Em Tmáx-9: C, $n = 8$; FOR, $n = 11$; NFOR, $n = 6$. *Indica aumento em relação aos grupos FOR e NFOR.