UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ADRIANA CALDO SILVA

Efeitos do *overreaching* não funcional sobre a via da mTOR no tecido
hepático de camundongos

Ribeirão Preto

2016

ADRIANA CALDO SILVA

Efeitos do *overreaching* não funcional sobre a via da mTOR no tecido hepático de camundongos

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação Serviço de Documentação da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

Nome: SILVA, Adriana Caldo

Título: Efeitos do *overreaching* não funcional sobre a via da mTOR no tecido hepático de camundongos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito parcial do título de Mestre no Programa de pós-graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais *Dina e Paulo* que sempre foram meu norte, meus exemplos de vida, luta, caráter e determinação serei eternamente grata a vocês, mãe obrigada pelas várias empadas (só nós duas sabemos o significado) pai obrigada ao “paitrocínio” algumas vezes, e por me fazer acreditar a nunca desistir dos meus sonhos. Aos meus avós pelos infinitos agrados, humor ácido e muita sabedoria. Aos meus anjos, *Isabela e Pedro* meus “filhos” de coração, que despertou em mim o sentimento mais puro e perfeito, minha irmã *Patrícia*, pelos conselhos e puxões de orelha de uma “mãe”. Muito obrigada a todos, amo vocês !!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, que será sempre minha luz e meu caminho por toda eternidade.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. *Adelino* pela perseverança, obrigada por tudo, tudo mesmo! Alavancou-me, em meu futuro acadêmico.

Agradeço ao Professor Dr. Gallo Júnior, da Medicina que me deu oportunidade de assistir suas aulas na Cardiologia e seu laboratório de fisiologia do exercício.

Agradeço ao Professor Dr. *Marcelo Papoti* e a todos os Professores da EEFERP.

Agradeço aos alunos do grupo de estudos NESGEF

Agradeço aos meus queridos alunos da academia Atenas, pela paciência, parceria e ausência e por me tolerarem durante as aulas no decorrer deste projeto, as loucuras, hospício etc... polo aquático divertidíssimo e também, Adriana saiu do grupo, Adriana removeu...do grupo, no mínimo engraçado.

Agradeço a paciência, atenção e ajuda na digitação deste projeto das amigas *Valéria* e *D. Shirley* pelos lanchinhos, almoço... isso não tem preço e desculpa a bagunça em sua casa que não foi pouca.

E porque não agradecer também, aos inúmeros obstáculos e pedras no caminho, me despertou para uma nova Adriana que descobri a garra e determinação que jamais soube ter.

Muito Obrigada !!

EPIGRAFE

VENCERÁS

Não desanimes.
Persiste mais um tanto.
Não cultives o pessimismo.
Centraliza-te no bem a fazer.
Esquece as sugestões do medo destrutivo.
Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.
Avança ainda que seja por entre lágrimas.
Trabalha constantemente.
Edifica sempre.
Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.
Não te impressiones nas dificuldades.
Convence-te que a vitória espiritual é construção para o dia-a-dia.
Não desistas da paciência.
Não creias em realizações sem esforço.
Silêncio para a injúria.
Ouvido para o mal.
Perdão às ofensas.
Recorda que os agressores são doentes.
Não permitas que os irmãos desequilibrados te destruam o trabalho ou te apaguem a esperança.
Não menosprezes o dever que a consciência te impõe.
Se te enganaste em algum trecho do caminho, reajusta a própria visão e procura o rumo certo.
Não conte vantagens nem fracassos.
Não dramatizes provocações ou problemas.
Conserva o hábito da oração para quem se te faz a luz na vida íntima.
Resguarda-te em Deus e persevera no trabalho que Deus te confiou.
Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar.
Age auxiliando.
Serve sem apego.
E assim vencerás.

Emmanuel

If someone were to ask for the recipe for "becoming Olympic", I would say that the first prerequisite is to be joyful.

Pierre de Couberttin

RESUMO

SILVA, A. C. **Efeitos do *Overreaching* não funcional sobre a via da mTOR no tecido hepático de camundongos.** 2016. 56f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O propósito do presente estudo foi verificar os efeitos do *overtraining* (OT) nas proteínas relacionadas com a via de sinalização da *mammalian target of the rapamycin complex 1* (mTORC1), no conteúdo proteico de *sterol regulatory element binding protein-1* (SREBP-1) e nas características morfológicas do fígado de camundongos C57BL/6. Os animais foram divididos em grupo controle (CT), *overtraining* em declive (OTR/down), *overtraining* em aclone (OTR/up) e *overtraining* sem inclinação (OTR). Teste do rotarod, incremental, exaustivo e força de preensão foram utilizados para avaliação de *performance*. Após 36 horas o teste de força de preensão, os fígados foram removidos e utilizados para *immunoblotting* ou análises histológicas. A fosforilação da proteína kinase B (pAkt; Ser473), *mammalian target of the rapamycin* (pmTOR; Ser2448), *70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1* (pS6K1; Thr389) e da *AMP-activated protein kinase* (pAMPK; Thr172) foram significativamente maiores no grupo OTR/down quando comparado com os grupos CT e OTR. A fosforilação da *4E-binding protein-1* (p4E-BP1; Thr37/46) foi significativamente maior no grupo OTR/down quando comparado com o grupo CT. Os níveis proteicos de *sterol regulatory element binding protein-1* (SREBP-1; p125 precursor) foram significativamente maiores nos grupos OTR/down e OTR/up quando comparados com o grupo CT. Enquanto o grupo OTR/down apresentou sinais de esteatose com inchaço celular acompanhado de inflamação aguda, os grupos OTR/up e OTR demonstraram evidências de injúria hepática, com a presença de núcleos picnóticos, hepatócitos em balão e vacúolos citoplasmáticos. Conclui-se que o protocolo de OTR/down aumenta a modulação da via de sinalização da mTOR e induz a sinais de esteatose hepática.

Palavras-chave: *Overreaching* não funcional, *Overtraining*, mTOR, fígado.

ABSTRACT

SILVA, A. C. **Effects of nonfunctional overreaching of the mTOR pathway in hepatic tissue of mice.** 2016. 56f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The purpose of this study was to verify the effects of overtraining (OT) on the proteins related to the mammalian target of the rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling pathway, the protein content of the sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and the morphological characteristics in the livers of C57BL/6 mice. Rodents were divided into control (CT), overtrained by downhill running (OTR/down), overtrained by uphill running (OTR/up) and overtrained by running without inclination (OTR) groups. Rotarod, incremental load, exhaustive and grip force tests were used to evaluate performance. Thirty-six hours after the grip force test, the livers were removed and used for immunoblotting or histological analysis. The phosphorylation of the protein kinase B (pAkt; Ser473), mammalian target of the rapamycin (pmTOR; Ser2448), 70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1 (pS6K1; Thr389) and AMP-activated protein kinase (pAMPK; Thr172) were significantly higher in the OTR/down group when compared to the CT and OTR groups. The phosphorylation of the 4E-binding protein-1 (p4E-BP1; Thr37/46) was significantly higher in the OTR/down group when compared to the CT group. The protein levels of the sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1; p125 precursor) were significantly higher in the OTR/down and OTR/up groups when compared to the CT group. While the OTR/down group presented signs of steatosis with cell swelling accompanied by acute inflammation, the OTR/up and OTR groups demonstrated evidences of injury in liver, with the presence of pyknotic nuclei, ballooned hepatocytes and cytoplasmic vacuoles. In conclusion, the OTR/down protocol up-modulated the mTOR signaling pathway and induced signs of hepatic steatosis.

Key words: Nonfunctional overreaching, overtraining, mTOR, liver.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de <i>overtraining</i> em declive.....	26
Tabela 2 – Protocolo de <i>overtraining</i> em aclave.....	26
Tabela 3 – Protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desempenho referente aos testes físicos realizados e parâmetros metabólicos; (A) teste de carga incremental; (B) teste exaustivo; (C) teste do rotarod; (D) teste de força de preensão; (E) percentual de variação do peso corporal entre as semana 0 e 8; (F) percentual de variação da ingestão alimentar entre as semana 0 e 8. Dados correspondentes a média $\pm$ erro padrão médio de n=6 camundongos. CT= grupo sedentário; OTR/*down*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na descida; OTR/*up*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na subida; OTR= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* sem inclinação. *P<0.05 vs. Semana 0 do mesmo grupo experimental. **P<0.05 vs. Semana 4 do mesmo grupo experimental. †P<0.05 vs. Grupo CT no mesmo período experimental. #P<0.05 vs. Grupo CT. \$P<0.05 vs. Grupo OTR/*up*..... **34**

Figura 2 – Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de pAkt(Ser473)/Akt (A), pmTOR(Ser2448)/mTOR (B), pS6K1(Thr389)/S6K1 (C), pS6RP(Ser235/236)/S6RP (D) e p4E-BP1(Thr37/46)/4E-BP1 (E) no fígado dos grupos experimentais. Dados correspondentes a média $\pm$ erro padrão médio de n=6 camundongos. CT= grupo sedentário; OTR/*down*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na descida; OTR/*up*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na subida; OTR= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* sem inclinação. *P<0.05 vs. Grupo CT. ††P<0.05 vs. GrupoOTR..... **35**

Figura 3 – Níveis protéicos (unidades arbitrárias) de pAMPKalfa(Thr172)/AMPKalfa (A), pTSC2(Ser939)/TSC2 (B), SREBP-1(p125 precursor)/beta-actina (C) e SREBP-1(p68 proteína maturada)/beta-actina (D). Dados correspondentes a média $\pm$ erro padrão médio de n=6 camundongos. CT= grupo sedentário; OTR/*down*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na descida; OTR/*up*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na subida; OTR= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* sem inclinação. *P<0.05 vs. Grupo CT. ††P<0.05 vs. GrupoOTR..... **36**

Figura 4 – Análise histológica do fígado corado com Hematoxilina e Eosina (A-D), Tricrômio de Masson (E-H) e Ácido Periódico de Shiff (I-L). CT= grupo sedentário; OTR/down= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na descida; OTR/up= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na subida; OTR= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* sem inclinação. * Vacúolos citoplasmáticos. → Núcleos picnóticos. ➤ Núcleo com cromatina densa. ➤ Grande vacúolo de lipídeo no citoplasma ➤ Fibrose pericelular.....

37

Figura 5 – Modelo proposto de esteatose hepática no protocolo de *overtraining* baseado em exercício excêntrico. Quando Akt é fosforilada induz a ativação da mTOR, levando a subsequente ativação de seus substratos, 4E-BP1 e S6K1, que tem a capacidade de aumentar a clivagem de SREBP-1 e seu RNAm. Quando a mTOR é ativada, o complexo mTOR/NF-kB também se dissocia, liberando o NF-kB para realizar a translocação para o núcleo e suprimir a expressão de PTEN, um inibidor da Akt, via diminuição de seus fatores de transcrição. Ativação das proteínas IKK e JNK também podem modular positivamente a translocação de NF-kB para o núcleo. GSK-3beta, uma proteína alvo da S6K1, quando ativada, perde sua capacidade de degradação protéica da SREBP-1 maturada, fazendo com que aumente sua característica lipogênica. AMPK quando ativada regula negativamente o conteúdo de SREBP-1 maturada, via inibição da clivagem de sua forma precursora.....

38

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP1 - proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E

ACC - acetil coenzima A carboxilase

ACC1 - acetil coenzima A carboxilase 1

Acetil-CoA - acetil coenzima A

ACSM - *American College of Sports Medicine*

Akt/PKB - proteína quinase

AMP - adenosina monofosfato.

AMPK - proteína quinase 5-AMP

ATP - trifosfato de adenosina

cAMP - adenosina 3,5 monofosfato

ECSS - *European College of Sport Science*

EE - exercício excêntrico

eIF2B - fator de iniciação eucariótico

eIF4G - fator de iniciação eucariótico 4G

FAS - ácido graxo sintase

FOR - *overreaching* funcional

FOXO - fatores de transcrição forkhead Box O

GH - hormônio do crescimento

GLUT4 - transportador de glicose tipo 4

GSK3 β - glicogênio sintase quinase

HE – hematoxilina e eosina

IGF1 – fator de crescimento semelhante a insulina 1

Malonil CoA - malonil coenzima A

mTOR - *mammalian target of the rapamycin*

mTORC1 - *regulatory associated protein of mTOR*

mTORC2 - *rapamycin-insensitive companion of mTOR*

NF-K β - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NFOR - *overreaching* não funcional

OT - *overtraining*

OTS - *síndrome do overtraining*

PA – *periodic acid-Schiff*

PBS – *phosphate buffer saline*

PI2P - *fosfatidilinositol-2-fosfato*

PI3K - *fosfatidilinositol-3-quinase*

PI3P - *fosfatidilinositol-3-fosfato*

PIKKs - *phosphoinositide-3 kinase related kinase*

PIP3 - *fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato*

PPARg - *peroxisome proliferator-activated receptor g*

PTEN - *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*

S6K1; Thr389 - *70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1*

SCD1 - *estearoil COA desaturase 1*

Smad 3 – *SMAD family member 3*

SREBP-1C - *Sterol regulatory element-binding protein 1c*

TSC2 - *tuberous sclerosis protein 2*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Exercício físico e <i>overtraining</i>	16
2.2	Exercício físico e o tecido hepático.....	19
2.3	A via de sinalização da mTOR.....	21
3	OBJETIVO.....	24
3.1	Objetivo Geral.....	24
3.2	Objetivo Específico.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	Animais expererimentais.....	25
4.2	Teste de carga incremental.....	25
4.3	Protocolo de <i>overtraining</i> em declive (OTR/down).....	25
4.4	Protocolo de <i>overtraining</i> em aclave (OTR/up).....	26
4.5	Protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação (OTR).....	27
4.6	Avaliação do desempenho físico.....	27
4.6.1	Teste de rotarod.....	27
4.6.2	Teste exaustivo.....	28
4.6.3	Teste de força de preensão.....	28
4.7	Avaliação de parâmetros metabólicos.....	28
4.8	Extração do tecido hepático.....	28
4.9	Técnica de immunoblotting.....	29
4.10	Histologia.....	30
5	ANÁLISE DE RESULTADOS.....	31
6	RESULTADOS.....	32
7	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Para desenvolver as capacidades físicas, especialmente em esportes de alto rendimento, sessões de treinamento são utilizadas para melhoria contínua do desempenho. O programa de treinamento, desenvolvido durante todo o período preparatório e competitivo, precisa perturbar a homeostase celular para induzir a supercompensação, sendo necessário o aumento contínuo da carga de treinamento, no entanto, de forma razoável. Quando o balanço entre sessões de treinamento e recuperação não são respeitados (densidade de treinamento aumenta drasticamente), possam levar a um estado de fadiga, *overreaching* funcional (FOR), *overreaching* não funcional (NFOR) ou síndrome de *overtraining* (OTS), dependendo da persistência nestes períodos (MEEUSEN et al., 2013). FOR pode ser descrito como uma diminuição no desempenho à curto prazo sem a presença de sintomas fisiológicos ou psicológicos graves, sendo revertida após alguns dias de recuperação, com a presença de supercompensação (MEEUSEN et al., 2013).

Se o período de *overtraining* é mantido sem a recuperação adequada, o atleta pode alcançar o estado de NFOR, definida como uma diminuição de desempenho associado a distúrbios psicológicos e/ou fisiológicos, que necessita de semanas ou meses para a recuperação do desempenho, sem a presença de supercompensação. Já o OTS é definido como uma síndrome de etiologia multifatorial, com decréscimo de desempenho que pode durar meses ou anos (MEEUSEN et al., 2013). A fim de desvendar os mecanismos que podem explicar os sintomas do NFOR, PEREIRA et al., (2012) desenvolveram um protocolo de *overtraining* para camundongos baseado em sessões de corrida em declive, que foi capaz de induzir aumentos de citocinas pró-inflamatórias em amostras de músculo e de soro (PEREIRA et al., 2014a) e comprometimento da via de sinalização de insulina em amostras de músculo (PEREIRA et al., 2014b).

Recentemente, ROCHA et al., (2015) desenvolveram um trabalho que mostrou que o estado de NFOR induzido por sessões de corrida em declive pode melhorar a via de sinalização da insulina hepática. Além disso, esses autores também verificam que a fosforilação da 70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1; Thr389), uma proteína alvo da *regulatory associated protein of mTOR* (mTORC1), foi aumentada após o exercício excêntrico (EE) induzido pelo modelo OT. A proteína quinase B (Akt; Ser473) ativa a via da mTORC1 pela fosforilação e inibição da ação da *tuberous sclerosis protein 2* (TSC2; Ser939). Após ativada pela Akt, a mTOR (Ser2448) fosforila a S6K1 (Thr389) e a *4E-binding protein*-

I (4EBP1; Thr37/46). A S6K1 fosforila a proteína ribossomal S6 (S6RP; Ser235/236), a qual promove a síntese proteica (POLAK; HALL, 2009).

Em contraste, a via da mTORC1 pode ser inibida por outras moléculas como a proteína quinase 5-AMP (AMPK; Thr172). No tecido hepático, a superativação da via Akt/mTORC1 induz a lipogênese pela regulação da ação da *sterol regulatory element binding protein-1* (*SREBP-1*) em várias etapas (CALVISI et al., 2011a; LI; BROWN; GOLDSTEIN, 2010; QUAN et al., 2013).

O fígado desempenha um papel importante em manter a homeostase glicêmica regulando a absorção e armazenamento de glicose e lipídios (RADZIUK; PYE, 2001). Várias adaptações decorrentes do treinamento físico moderado são descritas na literatura demonstrando o efeito benéfico desta prática (HOENE; WEIGERT, 2010), agindo como um regulador central do metabolismo lipídico no organismo e identificando o status de energia e disponibilidade de substratos de outros tecidos (LIRA et al., 2012). Entretanto, em certas condições, algumas modulações ocorrem em vias de sinalização causando desordens e o desenvolvimento de perfis patológicos, como a esteatose hepática. LI; BROWN; GOLDSTEIN, (2010) demonstraram que a ativação da mTOR é necessária para a estimulação da lipogênese através de via de sinalização de insulina, exibindo evidências de que a ação da insulina no fígado é necessária para o desenvolvimento da esteatose hepática. Estes resultados, em conjunto com os resultados descritos anteriormente em que camundongos desenvolveram NFOR através do protocolo de *overtraining* em corrida em declive mostrando uma maior regulação na sinalização da via da insulina hepática, com concomitante aumento na atividade da S6K1 (ROCHA et al., 2015), sugerem uma desregulação na via de sinalização da mTOR e, provavelmente, má adaptação do fígado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Exercício Físico e o *Overtraining*

Os benefícios do exercício físico regular vêm se tornando um importante tópico de estudo na literatura atual, provocando uma miríade de benefícios para a saúde, aumentando e atuando de forma positiva nos sistemas imunológico e cardiovascular, gerando mudanças e/ou adaptações morfofuncionais, corroborando com a diminuição e o controle de parâmetros inflamatórios e a prevenção e desenvolvimento de patologias. (LUEPKER et al., 1996; NEWTON; GALVÃO, 2008; SIMPSON et al., 2012; VIÑA et al., 2012).

Atletas normalmente usam sessões de treinamento de alta intensidade para melhorar e manter o desempenho. Para que os benefícios do exercício físico ocorram, sessões de treino devem ser quantificadas com cautela respeitando a capacidade de cada indivíduo com seu nível de adaptação, caso contrário, sessões de alta intensidade e/ou volume podem acarretar lesões musculares, além de outros danos ao organismo (ARMSTRONG, 1986; PEREIRA et al., 2014b). Durante o processo de intensificação do treinamento os atletas maximizam seu desempenho e como efeito agudo há sensação de fadiga e cansaço. Essa intensificação pode resultar em declínio do rendimento, entretanto, quando um período de recuperação apropriado é ofertado, o efeito da supercompensação pode ocorrer levando a um aumento da mesma quando comparado aos níveis basais. Havendo um desequilíbrio entre a carga de treinamento e o tempo de recuperação pode-se levar o atleta a um estado de *overtraining* (OT). A somatória de fatores estressantes ou a quebra dos princípios científicos do treinamento, tais como individualidade do treinamento, adaptação, sobrecarga, interdependência, especificidade, continuidade, além de fatores exógenos, pessoais, educacionais, ocupacionais, econômicos, nutricionais e a predisposição genética geram risco do desenvolvimento do *overtraining* (MEEUSEN et al., 2013).

Em um consenso entre a *American College of Sports Medicine* (ACSM) e *European College of Sport Science* (ECSS) a diminuição do desempenho pode ser resultado do *overreaching* funcional (FOR), *overreaching* não funcional (NFOR) e síndrome do *overtraining* (OTS). O FOR é caracterizado por uma queda de desempenho não relacionada com outros aspectos psicológicos e/ou fisiológicos que pode ser revertida após alguns dias de recuperação, levando a supercompensação. O NFOR é caracterizado por uma queda de desempenho associada com distúrbios psicológicos e hormonais como alterações no humor, perda de peso, distúrbios do sono, podendo ser revertida após semanas ou meses de

recuperação; e o OTS é caracterizado por uma queda de desempenho que pode perdurar durante meses ou anos. A diferenciação entre NFOR e OTS é complexa, uma vez que ambos estão relacionados com o estado catabólico acentuado, alterações bioquímicas, fisiológicas, psicológicas e do estado de humor (MEEUSEN et al., 2013).

A classificação do OT tem sido documentada em uma variedade de esportes que exigem força e resistência (KREHER; SCHWARTZ, 2012). Um estudo demonstrou que mais de 48% de mulheres corredoras de elite desenvolveram OT pelo menos uma vez em sua carreira (ROGERO; MENDES; TIRAPEGUI, 2005). Outro estudo demonstrou que 21% dos nadadores da equipe australiana desenvolveram a síndrome após seis meses de treinamento para uma competição nacional (KENTTÄ; HASSMÉN; RAGLIN, 2001). Além disso, KENTTÄ; HASSMÉN; RAGLIN, (2001) investigaram 272 jovens atletas de elite em vários esportes e demonstraram que 37% teriam desenvolvido OTS pelo menos uma vez em sua carreira.

Múltiplos sinais e sintomas são associados ao OT, no entanto não existem marcadores confiáveis e específicos para identificar os indivíduos mais vulneráveis a desenvolver OT, além disso, os mecanismos que levam ao OT não estão bem delimitados. Atualmente existem na literatura inúmeras teorias em relação OT, entre elas a teoria da fadiga central (ROBSON, 2003; STEINACKER et al., 2004), teoria do glicogênio (LEHMANN et al., 1998) e teoria das citocinas (BARRON et al., 1985).

A hipótese da fadiga central envolve o fato que durante exercício físico intenso e prolongado poderia haver um aumento da captação de triptofano pelo hipotálamo, levando a uma maior síntese de serotonina e, conseqüentemente a elevação da concentração hipotalâmica de serotonina, o que seria crucial para o desenvolvimento da fadiga e sensação de desmotivação. Entretanto, alguns autores supõem que a ativação do sistema autônomo é uma consequência da síndrome do *overtraining* e não uma causa (ROBSON, 2003).

Já a teoria do glicogênio acredita que a menor quantidade de glicogênio muscular levaria a queda de *performance*, assim como, queda nas concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada, isso resultaria em fadiga decorrente da alteração na síntese de neurotransmissores centrais. Logo a diminuição do glicogênio muscular resultaria em queda de *performance* e fadiga, levando ao OTS (LEHMANN et al., 1998; SMITH, 2000).

Em relação a teoria das citocinas, a contração muscular e repetitiva causa micro traumas no tecido, levando a ativação da resposta inflamatória local e recrutamento das citocinas. Tal processo leva a cicatrização e fortalecimento dos tecidos, entretanto, mantendo-se a intensidade do exercício e na ausência de repouso adequado a resposta inflamatória pode

torna-se crônica e patológica. A presente hipótese também alega que o triptofano é usado para síntese de proteínas inflamatórias, tendo seus níveis diminuídos com a inflamação sistêmica, associando-se com os sintomas de depressão como visualizado em atletas com OTS (BARRON et al., 1985; STEINACKER et al., 2004).

De acordo com revisões de literatura sobre o tema *overtraining* (KREHER; SCHWARTZ, 2012) avanços nessa área de estudo não têm ocorrido devido à variabilidade dos desenhos experimentais e à falta de atletas dispostos a arriscarem uma temporada de treinamento, saúde, liberação de seus respectivos clubes, patrocínio para que o avanços da ciência possam ocorrer. Além disso, os critérios para a classificação do OT podem ser diferentes entre os estudos, limitando a comparação dos resultados e tornando inviável a padronização das respostas fisiológicas e psicológicas (KREHER; SCHWARTZ, 2012). Sabe-se que os estudos com seres humanos devem seguir procedimentos éticos com o objetivo de preservar a saúde dos participantes. Portanto, é necessário considerar os riscos profissionais e sociais ao submetermos um grupo de atletas a um protocolo para indução do OR e OT. Nesse sentido, a Sociedade Americana de Fisiologia (*American Physiology Society*) incentiva a utilização de modelos animais quando não é apropriado estudar os efeitos do exercício físico nos seres humanos (MEEUSEN et al., 2013). Assim, PEREIRA et al., (2012) desenvolveram um protocolo de *overtraining* (OT) para camundongos com base em sessões de corrida em declive, a qual aumentaram os níveis intramusculares e séricos de algumas citocinas pró-inflamatórias (PEREIRA et al., 2014a), além do prejuízo na transdução do sinal de insulina no músculo (PEREIRA et al., 2014b). Por outro lado, ROCHA et al., (2015) verificaram que esse mesmo protocolo de OT melhorou a via de sinalização da insulina hepática. Também verificou-se que a fosforilação da S6K1 (Thr389), uma proteína alvo da mTOR, estava regulada positivamente após o exercício excêntrico (EE) induzido pelo modelo de OT (ROCHA et al., 2015). O exercício físico agudo e ou crônico com predomínio de ações excêntricas está associado com hipertrofia muscular através da ativação da via de sinalização da mTOR (PARKINGTON et al., 2003; PETERSON et al., 2011). Existem geralmente duas vias moleculares principais de sinalização responsáveis pelo crescimento muscular: a) via de ativação (IGF1 – fator de crescimento semelhante a insulina 1 - PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase - Akt/PKB – proteína quinase B - mTOR); b) via de inibição (miostatina – Smad 3 – SMAD *family member 3*)(DEVOL et al., 1990; GOODMAN et al., 2013).

2.2 Exercício físico e tecido hepático

O exercício físico ocasiona alterações metabólicas e requer ajustes orgânicos para manutenção da homeostase. Esses ajustes incluem a liberação de hormônios reguladores do metabolismo energético, a fim de prover a energia necessária para o esforço físico e manutenção/ganho da *performance*. O controle da disponibilidade de substratos energéticos durante o exercício físico é consequência, principalmente, da ação da insulina, e seus hormônios contrarreguladores que agem no fígado, o qual apresenta importante papel no suprimento de substratos à musculatura ativa através da glicólise e neoglicogênese (AFONSO et al., 2003).

Estudos sugerem que o aumento habitual da prática do exercício físico está inversamente associado com o conteúdo de triglicérides intra-hepático (PERSEGHIN et al., 2007), sendo portanto comumente prescrito como tratamento coadjuvante da esteatose alcoólica não hepática (RECTOR et al., 2008). Durante o exercício físico, a acetil coenzima A carboxilase 1 (ACC1) converte acetil coenzima A (acetil CoA) à malonil coenzima A (malonil CoA), usada para síntese de ácido graxos que serão utilizados para a formação de triglicérides e outras lipoproteínas hepáticas, as quais serão posteriormente distribuídas para os tecido periféricos. Esse processo é regulado, principalmente, pela insulina (STOECKMAN; TOWLE, 2002), que apresenta a habilidade de aumentar a transcrição de genes decodificadores de acetil CoA carboxilase, ácido graxo sintase, glicerol-3-fosfato acil transferase, entre outros (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002).

A ativação da lipogênese hepática insulino dependente é mediada pelo fator de transcriptase ligada a membrana, *Sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP-1c), que é ativada pela mTOR (LI; BROWN; GOLDSTEIN, 2010) e também pela PI3K e Akt (RIBAUX; IYNEDJIAN, 2003). A SREBP-1c desempenha um importante papel na regulação da maioria dos genes hepáticos lipogênicos, como a ácido graxo sintase, a acetil coenzima A carboxilase 1, a *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α) e a estearoil CoA desaturase 1 (SCD1), uma enzima lipogênica central que catalisa a dessaturação delta 9-cis da gordura saturada acil-CoA usada na biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAS) (BROWN; GOLDSTEIN, 1997). Experimentos com ratos *knockout* mostraram que a inativação do gene da SREBP-1c hepática reduz em aproximadamente 50% os triglicérides hepáticos (YAHAGI, 2002).

Um contrarregulador da sinalização insulínica é a *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) uma proteína também reguladora da lipogênese hepática que tem como principal

substrato a fosfatidilinositol – 3,4,5 trifosfato (PIP3), um mensageiro lipídico secundário gerado pela ação das PI3Ks. Estudos mostram que hepatócitos deficientes de PTEN desenvolvem esteato hepática através da indução da SREBP1 mediada pela PI3K, com consequente elevação da PPAR, envolvida na regulação da acil CoA oxidase, peroximal 3-cetoacil CoA tiolase e peroximal enoil CoA hidratase (HORIE et al., 2004). A principal isoforma de ACC hepática pode ainda ser fosforilada e inativada pela proteína quinase dependente adenosina monofosfato (AMP) e pela proteína quinase ativada 5-AMP (AMPK), ou inativada pela epinefrina ou pelo glucagon, através de um mecanismo ainda não esclarecido (HARDIE; CARLING, 1997).

Durante o esforço físico, há liberação do hormônio do crescimento (GH) que inibe o consumo de glicose circulante e estimula a liberação de ácidos graxos pelo fígado, assim como alterações na secreção das catecolaminas cuja função é promover a glicogenólise hepática, elevando os níveis glicêmicos (POWERS; HOWLEY, 2004). A relação entre a AMPK, ACC e malonil CoA hepática durante o exercício físico ainda não foram extensamente estudadas, entretanto, sabe-se que a intensidade e duração do exercício físico está associada à magnitude da oxidação das lipoproteínas e a fosforilação dessas moléculas hepáticas (CARLSON; WINDER, 1999). Estudo prévios com ratos corredores mostraram que, durante exercícios prolongados, há aumento da adenosina 3,5 monofosfato (cAMP) de maneira correlacionada a taxa glicogenolítica hepática (WINDER; BEATTIE; FULLER, 1983). Já no exercício intenso de curta duração, há aumento da AMPK, com decréscimo da malonil CoA e decréscimo da frutose 2,6 bifosfato levando a diminuição da glicólise e aumento da gliconeogênese (WINDER; BEATTIE; FULLER, 1983).

CINTRA et al., (2012) avaliando camundongos com esteatose hepática submetidos à um programa de treinamento aeróbico diário (50 minutos de corrida, cinco vezes por semana), observaram que a rotina de exercícios foi capaz de reduzir significativamente a SREBP hepática, a ácido graxo sintase e a SCD1, assim como o aumento da fosforilação da ACC após o exercício, atenuando a esteatose previamente instalada. Sabe-se ainda, que o exercício físico é capaz de aumentar a taxa de síntese de glicogênio muscular refletindo uma melhora na resposta insulínica (RABØL et al., 2011) associada com o aumento da fosforilação da Akt no músculo esquelético, assim como maior expressão e translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), durante e após a atividade (MARINHO et al., 2014). Estudos mostram que este aumento da Akt auxilia na redução da taxa de síntese de triglicérides hepático evitando o acúmulo de lipídeos no tecido através da regulação da PTEN e o complexo de sinalização da mTOR (SCHULTZE, 2013).

2.3 A via de sinalização da mTOR

A mTOR é uma proteína quinase, com peso molecular de 289kDa, 2549 aminoácidos e da família das *phosphoinositide-3 kinase related kinase* (PIKKs) (Hay e Sonenberge, 2004). A mTOR regula processos biológicos como crescimento e sobrevivência celular através de sinais intra e extracelulares, como fator de crescimento, nutrientes, níveis de energia. Também está relacionada com a diferenciação e regeneração das células musculares, na qual associa-se com o aumento do conteúdo proteico do GLUT4 (MORENO et al., 2003).

A mTOR possui dois complexos distintos, a *regulatory associated protein of mTOR* (mTORC1) e a *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (mTORC2). A mTORC1 é uma proteína raptor envolvida com o crescimento celular em resposta ao estímulo anabólico. Está envolvido no processo de tradução, autofagia, metabolismo de glicose e biogênese mitocondrial (WANG; PROUD, 2006). A mTORC2 é uma proteína rictor que modula a ativação da AKT e está envolvida na regulação do metabolismo da glicose e de lipídeos no tecido adiposo, muscular e hepático. A síntese proteica estimulada pela mTOR ocorre por três proteínas principais: a P70 ribossomal S6 quinase (P70S6K), a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4EBP1) e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) (PARKINGTON et al., 2003).

A insulina e o IGF-1 através da AKT promovem a ativação da mTOR direta ou indiretamente. A Akt pode ativar diretamente a mTOR pela fosforilação do resíduo ser2448. A proteína Akt ou ainda PKB (proteína quinase B) exerce um papel fundamental na sinalização intracelular para síntese de proteínas. Uma cascata de reações se inicia com a ativação de uma proteína de membrana, a PI3K. A ativação da PI3K por meio de um ligante específico irá fosforilar o fosfolipídio de membrana fosfatidilinositol-2-fosfato (PI2P) e converte-lo em fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), gerando um sítio de ligação na membrana plasmática para a Akt. Um dos principais fatores que levam a ativação da PI3K é a interação entre o IGF-1 com seu receptor, ativando-a (YAMADA; VERLENGIA; BUENO JUNIOR, 2012). Após a ativação, a Akt poderá tanto inibir vias de degradação proteica como ativar vias de sinalização para síntese de proteínas. Sua ação como inibidora do processo de degradação proteica se manifesta quando fosforila as enzimas glicogênio sintase quinase (GSK3 β), fatores de transcrição *forkhead Box O* (FOXO) e *tuberous sclerosis protein 2* (TSC2), responsáveis pela diminuição do processo de tradução, através da inibição do fator de iniciação eucariótico eIF2B (com impedimento da transcrição gênica) e inibição da mTOR. (HORNBERGER et al., 2007; LÉGER et al., 2006). Já a sinalização para síntese de proteínas continua com a ativação

da enzima mTOR, responsável por controlar o crescimento celular (DELDICQUE; THEISEN; FRANCAUX, 2005). O controle da síntese proteica pela mTOR se dá pela fosforilação de duas outras enzimas, a 4EBP1 e a P70S6K. A enzima 4EBP1 em repouso está associada com um fator de iniciação eucariótico denominado eIF4B. Após sua fosforilação a associação é desligada permitindo assim o início da tradução (FUJITA et al., 2007; WANG; PROUD, 2006).

Uma proteína essencial na via da PI3K/Akt é a PTEN, um regulador negativo da sinalização da insulina. Ácidos graxos insaturados desencadeiam a diminuição na expressão de PTEN a nível do RNAm, através da ativação de um complexo de sinalização da mTOR e da *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) (VINCIGUERRA et al., 2008).

A mTOR pode ser ativada independentemente da sinalização da via Akt pelo ácido fosfatídico dependente da fosfolipase-D, assim como pode ser regulada por aminoácidos e pelo seu status de energia (HORNBERGER et al., 2007). Dentro dos aminoácidos de cadeia ramificada, a leucina tem papel fundamental na regulação de processos anabólicos relacionados a síntese proteica. MA; BLENIS, (2009) demonstraram que ratos que foram privados de ingerir leucina tiveram uma diminuição na fosforilação da mTOR e S6K1, assim como a privação de leucina aumentou a sinalização de insulina no fígado. Tais autores sugerem então que o aumento da sensibilidade a insulina pode ser devido a diminuição da atividade da mTOR/S6K1.

Já a ativação da TSC2 mediada pela AMPK pode modular a sinalização da mTOR pela depleção do trifosfato de adenosina (ATP) celular. A ativação da AMPK decorrente de um estado de estresse energético, como o exercício físico, tenta restituir o balanço energético pela inibição de vias anabólicas e estimulação de vias catabólicas. A AMPK é um sensor de energia que regula o metabolismo celular, incluindo também o metabolismo lipídico. É ativada pelo aumento dos níveis celulares de AMP. Também suprime a expressão de ACC e ácido graxo sintase (FAS) pela diminuição da expressão de SREBP-1c (KOHJIMA et al., 2008).

As proteínas SREBPs são fatores de transcrição ligadas a membrana e regulam a expressão de genes relacionados a síntese de lipídios, enquanto a SREBP-1C regula positivamente a expressão dos genes que codificam enzimas lipogênicas. Vale ressaltar que novas evidências indicam que a via da Akt/mTORC1 está envolvida na regulação da lipogênese, a qual seria induzida por mecanismo transcricional e pós transcricional. (KOHJIMA et al., 2008). Uma vez que a mTORC1 desempenha um papel na biossíntese de

lipídios, inibindo-a através da AMPK pode haver a diminuição da adiposidade no fígado e tecido adiposo. LI; BROWN; GOLDSTEIN, (2010) demonstraram que a supressão da S6K1 no fígado de ratos diminuiu significativamente a expressão de SREBP-1c e a acumulação de triglicerídeo hepático. No estudo de UM et al., (2004) camundongos deficientes da proteína S6K1 demonstraram aumento na capacidade de oxidação de ácidos graxos, em associação com o aumento do níveis de RNAm nos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos.

O fígado desempenha um papel importante na manutenção da homeostase glicêmica, regulando a absorção e armazenamento de glicose e lipídeos (RADZIUK; PYE, 2001). Várias adaptações decorrentes do treinamento físico moderado são descritas na literatura demonstrando o efeito benéfico desta prática através de uma resposta de estresse do fígado (HOENE; WEIGERT, 2010), sendo fundamental no metabolismo lipídico, na identificação do status de energia e na disponibilidade de substratos de outros tecidos (LIRA et al., 2012). No entanto, em determinadas condições, algumas modulações ocorrem em vias de sinalização que causam desordens e o desenvolvimento de perfis patológicos, tais como esteatose hepática. LI; BROWN; GOLDSTEIN, (2010) demonstraram que a ativação da mTOR é necessária para estimulação da lipogênese através da sinalização da via da insulina, evidenciando que a ação da insulina no fígado é exigida para o desenvolvimento da esteatose.

Recentemente, ROCHA et al., (2015) desenvolveram um trabalho que mostrou que o estado de NFOR induzido por sessões de corrida em declive pode melhorar a via de sinalização da insulina hepática. Também foram encontrados um aumento nos níveis da proteína *70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1* (S6K1) nos hepatócitos. Já está bem descrito na literatura (POLAK; HALL, 2009) que a S6K1 é uma proteína chave da *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e que essa via está relacionada com funções anabólicas e, especificamente no fígado, estudos tem demonstrado um *link* entre a sinalização da via da mTOR e lipogênese (CALVISI et al., 2011a; LI; BROWN; GOLDSTEIN, 2010; QUAN et al., 2013).

LI et al., (2011) mostraram que a inibição da expressão da S6K1 no fígado de camundongos diminuiu a expressão de SREBP-1 e o acúmulo de triglicerídeo hepático. Uma vez que ROCHA et al., (2015) verificaram que o EE induzido pelo modelo de OT aumenta a fosforilação hepática de S6K1, nossa hipótese é que camundongos submetidos a este protocolo poderiam apresentar uma maior regulação da SREBP-1c e aumento da lipogênese.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos do protocolo de Pereira et al (PEREIRA et al., 2012) na corrida em declive nas proteínas hepáticas relacionadas a via de sinalização da mTOR em camundongos C57BL/6.

3.2 Objetivo Específico

Verificar o conteúdo do SREBP-1c e as características morfológicas do fígado, assim como, comparar o protocolo de OT com base no exercício excêntrico com outros dois protocolos com a mesma intensidade e volume, mas realizados em alicive e sem inclinação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados 40 camundongos C57BL/6 com 8 semanas de vida provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) em um ciclo invertido de 12h claro-escuro, com livre acesso a ração (Purina) e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (ID 14.1.873.53.0). Os camundongos foram divididos em 4 grupos: Controle (C; n=10; sedentários que realizaram os testes físicos), *Overtraining* em declive (OTR/*down*; n=10; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em aclave (OTR/*up*; n=10; submetidos ao protocolo de *overtraining* em aclave) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; n=10; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Os camundongos dos grupos CT, OTR/*down*, OTR/*up* e OTR foram manipulados e/ou treinados em um quarto escuro entre 6-8h da manhã.

4.2 Teste de carga incremental

Os animais adaptaram-se ao exercício em esteira rolante (INSIGHT[®], Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) durante 5 dias, 10min/dia na velocidade de 3m/min. O teste de carga incremental iniciou-se na velocidade de 6m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3m/min a cada 3min até a exaustão voluntária dos camundongos, que ocorreu quando os mesmos encostaram 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min. Os animais foram encorajados com estímulos físicos. A potência máxima (Pmax), definida como a velocidade (m/min) de exaustão do animal, foi utilizada para a prescrição de intensidade nos protocolos de OTR/*down*, OTR/*up* e OTR (KUIPERS et al., 1985).

4.3 Protocolo de *overtraining* em declive (OTR/*down*)

O protocolo de OTR/*down* foi realizado conforme padronizado por PEREIRA et al., (2012) e composto por 8 semanas divididas em 5 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A tabela 1 apresenta as

características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo do OTR/*down*.

Tabela 1. Protocolo de *overtraining* em declive

Semana	Fase do treinamento	Intensidade (%Pmax)	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação	Intervalo entre as sessões (h)
1	F1	60	15	1	0	24
2	F1	60	30	1	0	24
3	F1	60	45	1	0	24
4	F1	60	60	1	0	24
5	F2	60	60	1	-14	24
6	F3	70	60	1	-14	24
7	F4	75	75	1	-14	24
8	F5	75	75	2	-14	4

4.4 Protocolo de *overtraining* em active (OTR/*up*)

O protocolo de OTR/*up* foi baseado no estudo de PEREIRA et al., (2012) e composto por 8 semanas divididas em 5 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A tabela 2 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo do OTR/*up*.

Tabela 2. Protocolo de *overtraining* em active.

Semana	Fase do treinamento	Intensidade (%Pmax)	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação	Intervalo entre as sessões (h)
1	F1	60	15	1	0	24
2	F1	60	30	1	0	24
3	F1	60	45	1	0	24
4	F1	60	60	1	0	24
5	F2	60	60	1	14	24
6	F3	70	60	1	14	24
7	F4	75	75	1	14	24
8	F5	75	75	2	14	4

4.5 Protocolo de *overtraining* sem inclinação (OTR)

O protocolo de OTR foi baseado no estudo de PEREIRA et al., (2012) e composto por 8 semanas divididas em 5 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A tabela 3 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo do OTR.

Tabela 3. Protocolo de *overtraining* sem inclinação

Semana	Fase do treinamento	Intensidade (%Pmax)	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação	Intervalo entre as sessões (h)
1	F1	60	15	1	0	24
2	F1	60	30	1	0	24
3	F1	60	45	1	0	24
4	F1	60	60	1	0	24
5	F2	60	60	1	0	24
6	F3	70	60	1	0	24
7	F4	75	75	1	0	24
8	F5	75	75	2	0	4

4.6 Avaliação do desempenho físico

A avaliação do desempenho físico dos camundongos ocorreu antes do início dos protocolos experimentais e 48h após as últimas sessões dos protocolos OTR/*down*, OTR/*up* e OTR nas semanas 4 e 8, e foi composta pelo teste do rotarod (PEREIRA et al., 2014b; ROCHA et al., 2015; TURGEMAN et al., 2008), teste de carga incremental (DAVIS, 2000; PEREIRA et al., 2012, 2014b; ROCHA et al., 2015), teste exaustivo (PEREIRA et al., 2012, 2014b; ROCHA et al., 2015) e teste de força de preensão (PEREIRA et al., 2012, 2014b; ROCHA et al., 2015).

4.6.1 Teste do rotarod

Após 48 horas das últimas sessões dos protocolos experimentais, o teste do rotarod foi realizado. Nesse teste, o aparelho foi programado para iniciar com velocidade de 1rpm e final de 40rpm, alcançada 300s após o início do movimento. A aceleração durante todo teste foi constante, sendo realizadas três tentativas por animal, com intervalo de 10s, e o tempo (s) até

a queda de cada animal foi registrado (PEREIRA et al., 2012, 2014b; ROCHA et al., 2015). Após 4h da realização do teste do rotarod, os roedores realizaram o teste de carga incremental, conforme descrito no item 4.2 do presente projeto de pesquisa.

4.6.2 Teste exaustivo

Após 24 horas da realização do teste de carga incremental, os camundongos correram na velocidade de 36m/min com inclinação de 8% até exaustão voluntária, que ocorreu quando os mesmos encostaram 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min (PEREIRA et al., 2012, 2014b; ROCHA et al., 2015).

4.6.3 Teste de força de preensão

Após 4 horas da realização do teste exaustivo, os camundongos realizaram o teste de força de preensão com a grade não inclinada. Inicialmente, sem que os valores fossem considerados realizou-se três tentativas de preensão com ambas as patas (dianteiras e traseiras). Cada tentativa consistiu em tensionar o animal pela cauda, de modo que ambas as patas (dianteiras e traseiras) passassem por todos os arames da grade e o roedor se desprendesse da mesma. Posteriormente, foram realizadas tentativas válidas e os três maiores valores de tensão aplicados foram registrados em *Newton* (N) (PEREIRA et al., 2012, 2014b; ROCHA et al., 2015).

4.7 Avaliação de parâmetros metabólicos

Os camundongos dos grupos C, OTR/*down*, OTR/*up* e OTR foram avaliados diariamente quanto à variação do peso corporal e ingestão alimentar. A ingestão alimentar diária foi mensurada através da subtração do peso da ração final (peso da ração restante em cada gaiola individual ao final de 24h) pelo peso da ração inicial (peso da ração colocada em cada gaiola individual 24h antes do peso da ração final).

4.8 Extração do tecido hepático

Os animais foram anestesiados 36 horas após o teste de força de preensão manual. Depois de 12 horas de jejum noturno os animais foram anestesiados com injeções

intraperitoneais de 2-2-2 tribromoetanol 2,5% (10-20 μ L.g⁻¹). Assim que o efeito da anestesia foi confirmado pela perda de reflexos podais, a cavidade abdominal foi aberta, cada fígado do animal foi removido, triturado e homogeneizados em tampão de extração (1% de Triton X-100, 100mM Tris, pH 7,4, contendo 100mM de pirofosfato de sódio, o fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, 10mM de vanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL aprotinina) a 4°C com o auxílio de um *Polytron* PTA 20S gerador (*Brinkmann Instruments* modelo PT 10/35), operado em velocidade máxima durante 30s. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm durante 30min. No sobrenadante, foi determinada a concentração de proteínas utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.9 Técnica de *Immunoblotting*

As proteínas foram desnaturadas por fervura em tampão de amostra de *Laemmli* contendo DTT 100mM, executado em gel SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE *Healthcare*, *Hybond* ECL, RPN303D). A eficiência da transferência para membranas de nitrocelulose foi verificada por coloração breve das bandas com Ponceau. Estas membranas foram então bloqueadas com solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo 5% de BSA e 0,1% de *Tween-20*, durante 1 hora, a 4° C. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos específicos phospho-Akt (Ser473; CELL4058S), phospho-mTOR(Ser2448; CELL2971S), phospho-AMPKalpha (Thr172; CELL2535), AMPKalpha (CELL2532S), phospho-4EBP1 (Tyr37/46; CELL2855S) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); Akt (SC8312), phospho-p70 S6 kinase(Thr389; SC11759), p70 S6 kinase (SC230), phospho-tuberin (Ser939; SC32838), tuberin (SC893), mTOR (SC8319), *phospho-Ribosomal Protein* S6 (Ser2035/236; SC293144), Ribosomal Protein S6 (SC74459), 4EBP1 (SC6936), SREBP1 (SC366) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Após 16 horas a incubação com anticorpo primário, foram realizadas 5 lavagens de 5 min com TBS contendo 0,1% de *Tween-20*. Posteriormente, todas as membranas foram incubadas durante 1 hora a 4° C com anticorpo secundário. As bandas imunorreativas específicas foram detectadas por quimioluminescência (GE *Healthcare*, *ECL Plus Western Blotting Detection System*, RPN2132). As imagens foram adquiridas pelo *C-DiGit™ Blot Scanner* (LI-COR^R, Lincoln, Nebraska, USA) e quantificadas utilizando o *software Image Studio for C-DiGit Blot Scanner*. Os anticorpos foram provenientes das empresas *Cell Signalling Technology* (*Cell Signalling Technology, MA, USA*), *Santa Cruz Biotechnology* (*Santa Cruz*

Biotechnology Inc., CA, USA) de acordo com a disponibilidade. Os reagentes químicos de rotina foram provenientes da *Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA)*.

4.10 Histologia

Tecido hepático dos grupos experimentais foram fixados em formol 10% e dissolvidos em *phosphate buffer saline* (PBS; 0,1 M; pH 7,3) por 24 horas. As amostras foram desidratadas gradualmente no etanol, limpadas com xileno e incorporadas em Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO, USA). Para avaliações histopatológicas, lâminas de 4µm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), *Masson's trichrome* and *periodic acid-Schiff* (PAS). *Image-Pro Plus software version 4.5* para Windows foram utilizadas para digitalizar as imagens de cada secção histológica. As análises foram realizadas utilizando um fotomicroscópio digital *Axiophot II Zeiss Microscope*.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram expresso em média $\pm$ erro padrão. De acordo com o teste de *Kolmogorov-Smirnov* verificou-se distribuição e homogeneidade dos grupos. O teste one-way ANOVA foi utilizado para examinar os feitos dos protocolos de OT. Quando houve significância estatística, a *Newman-Keuls* post hoc foi utilizada. Todas as análises foram bilaterais e o nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* v.5.01 (GraphPad Software Inc[®], CA, USA).

6 RESULTADOS

Nas figuras 1A, 1B, 1C e 1D é possível observar os parâmetros de desempenho físico dos três protocolos de OT referentes aos testes realizados ao final das semanas 0, 4 e 8. A figura 1A representa os valores do teste de carga incremental, onde exibiram ganho de *performance* na semana 4 e queda na semana 8, comparados com suas respectivas semanas 0 e/ou 4. Em relação ao teste exaustivo (figura 1B), todos os grupos que realizaram os protocolos de OT exibiram ganho de *performance* na semana 4 e redução na semana 8, quando comparado as suas respectivas semanas 0 e 4, como também para o grupo CT no mesmo período experimental. Na figura 1C está demonstrado os valores obtidos no teste do rotarod, onde todos os grupos OT exibiram queda de *performance* na semana 8, quando comparado com suas respectivas semana 0 e/ou 4, sendo que somente o grupo OTR/*down* demonstrou menor valor quando comparado ao grupo CT para o mesmo período experimental. No teste de força de preensão (figura 1D) os grupos OTR/*down* e OTR exibiram aumento de *performance* na semana 4 quando comparado com suas respectivas semana 0, sendo que todos os grupos que passaram pelo protocolo de OT tiveram redução dos seus valores quando comparados com suas respectivas semanas 0 e/ou 4. Em relação aos parâmetros metabólicos, pode-se observar na figura 1E o percentual da alteração do peso corporal dos grupos experimentais entre suas respectivas semanas 0 e 8. O grupo OTR/*down* demonstrou menor alteração do peso corporal quando comparado ao grupo CT e OTR/*up*. Já na figura 1F, está demonstrado o percentual da variação da ingestão alimentar dos grupos experimentais entre suas respectivas semana 0 e 8, sendo que o grupo OTR/*up* demonstrou maior valor quando comparado ao grupo CT.

O grupo OTR/*down* mostrou aumento significativo nos níveis proteicos de pAkt (Ser473), pmTOR (Ser2448) e pS6K1 (Thr389) quando comparado com os grupos CT e OTR (Figura 2A, 2B e 2C, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para os níveis proteicos de pS6RP (Ser235/236) (Figure 2D). A Figura 2E mostra que os níveis proteicos de p4E-BP1 (Thr37/46) foram significativamente maiores no grupo OTR/*down* quando comparado com o grupo CT. O grupo OTR/*down* também demonstrou aumento significativo nos níveis proteicos de pAMPKalpha (Thr172) quando comparado com os grupos CT e OTR (Figura 3A). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para os níveis proteicos de pTSC2 (Ser939) e SRBP-1 (p68 madura) (Figuras 3B e 3D). Os grupos OTR/*down* e OTR/*up* apresentaram valores significativamente

mais elevados nos níveis da proteína SREBP-1 (percursor p125) quando comparados com o grupo CT (Figura 3C).

As Figuras 4A, 4E e 4I mostraram que os hepatócitos do grupo CT, a qual foram corados respectivamente com HE, *Masson's trichrome* e PAS, apresentaram características morfológicas normais. Em relação as amostras de fígado corada com HE, a Figura 4B mostrou que os hepatócitos do grupo OTR/*down* apresentaram vacúolos citoplasmáticos, inchaço e núcleos com cromatina densa. O grupo OTR/*up* também apresentou hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos e sinal de morte celular (Figura 4C). A Figura 4D mostrou que o grupo OTR apresentou algumas alterações relacionadas com a presença de núcleos picnóticos.

Em relação as amostras de fígado coradas com *Masson's trichrome*, a Figura 4F demonstrou que o grupo OTR/*down* apresentou fibrose pericelular. O grupo OTR/*up* apresentou hepatócitos hipertrofiados e desordem com aumento da área de colágeno. Além disso, este grupo exibiu traves hepáticas dispostos frouxamente, balonismo e pontes de fibrose (Figura 4G). A Figura 4H mostrou que o grupo OTR apresentou o rompimento dos hepatócitos, aumento dos balões dos hepatócitos e dilatação sinusoidal. Em relação as amostras de fígado coradas com PAS, o grupo OTR/*down* exibiu sinais de esteatose hepática, hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos graves e inchaço acompanhado de inflamação aguda (Figura 4J). A Figura 4K mostrou que o grupo OTR/*up* apresentou hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos, núcleos picnóticos e núcleos com cromatina densa. O grupo OTR apresentou hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos.

Figura 1 – Desempenho referente aos testes físicos realizados e parâmetros metabólicos; (A) teste de carga incremental; (B) teste exaustivo; (C) teste do rotarod; (D) teste de força de preensão; (E) percentual de variação do peso corporal entre as semana 0 e 8; (F) percentual de variação da ingestão alimentar entre as semana 0 e 8. Dados correspondentes a média $\pm$ erro padrão médio de $n=6$ camundongos. CT= grupo sedentário; OTR/down= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na descida; OTR/up= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na subida; OTR= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* sem inclinação. * $P<0.05$ vs. Semana 0 do mesmo grupo experimental. ** $P<0.05$ vs. Semana 4 do mesmo grupo experimental. † $P<0.05$ vs. Grupo CT no mesmo período experimental. # $P<0.05$ vs. Grupo CT. \$ $P<0.05$ vs. Grupo OTR/up.

Fonte: próprio autor

Figura 2 - Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de pAkt(Ser473)/Akt (A), pmTOR(Ser2448)/mTOR (B), pS6K1(Thr389)/S6K1 (C), pS6RP(Ser235/236)/S6RP (D) e p4E-BP1(Thr37/46)/4E-BP1 (E) no fígado dos grupos experimentais. Dados correspondentes a média $\pm$ erro padrão médio de n=6 camundongos. CT= grupo sedentário; OTR/down= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na descida; OTR/up= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na subida; OTR= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* sem inclinação. *P<0.05 vs. Grupo CT. ††P<0.05 vs. Grupo OTR.

Fonte: próprio autor

Figura 3 – Níveis protéicos (unidades arbitrárias) de pAMPKalfa(Thr172)/AMPKalfa (A), pTSC2(Ser939)/TSC2 (B), SREBP-1(p125 precursor)/beta-actina (C) e SREBP-1(p68 proteína maturada)/beta-actina (D). Dados correspondentes a média $\pm$ erro padrão médio de n=6 camundongos. CT= grupo sedentário; OTR/*down*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na descida; OTR/*up*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na subida; OTR= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* sem inclinação. *P<0.05 vs. Grupo CT. ††P<0.05 vs. Grupo OTR.

Fonte: próprio autor

Figura 4 – Análise histológica do fígado corado com Hematoxilina e Eosina (A-D), Tricrômio de Masson (E-H) e Ácido Periódico de Schiff (I-L). CT= grupo sedentário; OTR/*down*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na descida; OTR/*up*= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* em corrida na subida; OTR= grupo que realizou o protocolo de *overtraining* sem inclinação. * Vacúolos citoplasmáticos. → Núcleos picnóticos. ➤ Núcleo com cromatina densa. ➤ Grande vacúolo de lipídeo no citoplasma. ➤ Fibrose pericelular.

Fonte: próprio autor

Figura 5 - Modelo proposto de esteatose hepática no protocolo de *overtraining* baseado em exercício excêntrico. Quando Akt é fosforilada induz a ativação da mTOR, levando a subsequente ativação de seus substratos, 4E-BP1 e S6K1, que tem a capacidade de aumentar a clivagem de SREBP-1 e seu RNAm. Quando a mTOR é ativada, o complexo mTOR/NF-κB também se dissocia, liberando o NF-κB para realizar a translocação para o núcleo e suprimir a expressão de PTEN, um inibidor da Akt, via diminuição de seus fatores de transcrição. Ativação das proteínas IKK e JNK também podem modular positivamente a translocação de NF-κB para o núcleo. GSK-3β, uma proteína alvo da S6K1, quando ativada, perde sua capacidade de degradação protéica da SREBP-1 maturada, fazendo com que aumente sua característica lipogênica. AMPK quando ativada regula negativamente o conteúdo de SREBP-1 maturada, via inibição da clivagem de sua forma precursora.

Fonte: próprio autor

7 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As principais conclusões do presente estudo são: a) o grupo OTR/*down* apresentou aumento na atividade das proteínas pAkt (Ser473), pmTOR (Ser2448), pS6K1 (Thr389), p4E-BP1 (Thr37/46), pAMPKalpha (Thr172) e SREBP-1 (p125 precursor); b) o grupo OTR/*down* apresentou sinais de esteatose e inchaço celular acompanhado de inflamação aguda; c) Exceto o aumento na atividade de SREBP-1 (p125 precursor) no grupo OTR/*up*, outras proteínas não foram moduladas após os protocolos de OTR/*up* e OTR; d) os grupos OTR/*up* e OTR demonstraram evidências de injúria no fígado, com presença de núcleos picnóticos, hepatócitos em balão e vacúolos citoplasmáticos. Tomados em conjunto, esses dados indicam que o protocolo de OTR/*down* aumenta a modulação da via de sinalização da mTOR e induz a sinais de esteatose hepática.

A diferença encontrada no grupo OTR/*down* comparado ao grupo CT no percentual de alteração do peso corporal, está de acordo com os resultados encontrados nos trabalhos já publicados pelo nosso grupo de pesquisa (PEREIRA et al., 2012, 2014b). Segundo PEREIRA et al., (2015) o protocolo de OT baseado em contrações excêntricas foi capaz de induzir um quadro de inflamação hipotalâmica transitória que está associado com redução de peso corporal e ingestão alimentar. Em contrapartida, o aumento encontrado na ingestão alimentar do grupo OTR/*up* comparado ao grupo CT pode ser explicado pela particularidade do exercício de corrida na subida, demandando maior gasto energético comparado ao exercício de corrida na descida (DAVIS et al., 2007).

Na maioria dos testes físicos realizados, ao final da semana 4 que coincidiu com o período destinado ao treinamento com base na periodização de FERREIRA et al., (2007), os grupos OTR/*down*, OTR/*up* e OTR exibiram maiores valores comparados com suas respectivas semana 0 e/ou maiores valores comparados com o grupo CT na mesma semana. Esse aumento da *performance* física é decorrente do processo de treinamento, onde ocorrem as adaptações específicas dos estímulos de treino, demonstrando que o equilíbrio entre as cargas de treino e recuperação adequada proporcionam adaptações positivas no estado de treinamento (ROSCHEL; TRICOLLI; UGRINOWITSCH, 2011). De acordo com resultados prévios (PEREIRA et al., 2013, 2015; ROCHA et al., 2015), os testes realizados ao final dos protocolos de OT, após a oitava semana, todos os camundongos que passaram por esse período de *overtraining* exibiram uma queda de desempenho comparado as suas semanas 0 e/ou 4.

Recentemente, utilizando cepas diferentes de camundongos C57BL/6, ROCHA et al., (2015) verificaram que o protocolo de OTR/*down* melhorou a via da insulina hepática com concomitante aumento dos níveis proteicos de pS6K1 (Thr389), uma proteína alvo da mTORC1 (POLAK; HALL, 2009). Exceto para os níveis proteicos pS6RP (Ser235/236), outras proteínas relacionadas a via de sinalização hepática da mTOR aumentaram a sua modulação após o protocolo de OTR/*down*. Além disso, este modelo de OT também aumentou os níveis proteicos de SREBP-1 (p125 precursor). A interação da SREBP-1 precursora com a SREBP *cleavage-activating protein* (SCAP) cria um complexo com a *insulin-induced gene 1* (INSIG1) e INSIG2 a qual retém o SREBP-1 na membrana do retículo endoplasmático (RE). Após a estimulação da insulina o SREBP-1 sofre ação de duas proteases no aparelho de Golgi, libertando a forma madura da SREBP-1 (mSREBP-1), que conduz à expressão de vários genes lisogênicos (BAKAN; LAPLANTE, 2012; FERRÉ; FOUFELLE, 2010).

A Akt regula o SREBP-1 pela estimulação do seu transporte do RE para o aparelho de Golgi (YELLATURU et al., 2009). Além disso, BAKAN; LAPLANTE, (2012) revisaram os possíveis mecanismos pelos quais a mTORC1, uma proteína alvo da Akt, participa da regulação da SREBP-1: 1) a mTORC1 leva a lipogênese pela transmissão de alguns sinais anabólicos para a SREBP-1 (LI; BROWN; GOLDSTEIN, 2010; YECIES et al., 2011); 2) a mTORC1 fosforila a S6K1 que aumenta a SREBP-1 mRNA (LI et al., 2011); 3) a S6K1 também medeia o efeito da mTORC1 sobre a clivagem da SREBP-1 (DÜVEL et al., 2010); 4) a mTORC1 leva a tradução da SREBP-1 (YECIES et al., 2011); 5) a mTORC1 induz ao estresse do RE, o que facilita o processamento da SREBP-1, um evento necessário para a acumulação nuclear e ativação deste fator de transcrição (OZCAN et al., 2008); 6) a mTORC1 regula a localização nuclear da SREBP-1 pela fosforilação da Lipin-1 (PETERSON et al., 2011).

Embora o protocolo de OTR/*down* tenha aumentado os níveis proteicos de pAkt (Ser473), pmTOR (Ser2448), pS6K1 (Thr389) e p4E-BP1 (Thr37/46), a SREBP-1 (p68 madura) não foi alterada por esse modelo de OT. Essa contradição pode ser explicada pelo aumentos nos níveis proteicos de pAMPKalpha (Thr172), que tem a capacidade de suprimir a expressão de genes relacionados com a lipogênese através da diminuição da atividade da SREBP-1 (FRYER et al., 2002; LI et al., 2011; ZHOU et al., 2001). Após estimulada por fatores de *stress* que aumentam a relação entre o monofosfato de adenosina (AMP) e a adenosina-trifosfato (ATP), a AMPK é ativada para inibir a vias que consomem ATP e para

estimular múltiplos eventos que aumentem a geração de ATP (HARDIE, 2003). Além disso, o aumento de pAMPK (Thr172) está ligado à inibição da mTORC1 (MA; BLENIS, 2009).

Em contraste, aqui verificamos que o protocolo de OTR/*down* regulou positivamente as proteínas relacionadas com a via de sinalização da mTOR, mesmo com os altos níveis de pAMPK (Thr172). A AMPK hepática pode ser ativada por vários estímulos, incluindo o exercício físico e o estado nutricional (RUDERMAN et al., 2003; WITTERS et al., 1994). Porque os três protocolos OT foram realizadas utilizando a mesma carga externa (ou seja, o produto entre a intensidade e volume de treinamento), consideramos que o estado nutricional desempenhou um papel importante nos altos níveis de pAMPK (Thr172) observada para o grupo OTR/*down*. Além disso, PEREIRA et al., (2015) mostraram que o grupo de OTR/*down* apresentou uma ingestão alimentar menor em comparação com os outros grupos experimentais no final de semana 8, o que pode ter influenciado o aumento atual da pAMPK hepática (Thr172).

Em relação as análises histológicas, o grupo OTR/*down* exibiu sinais de esteatose hepática e inchaço celular acompanhado de inflamação aguda. A supressão específica no fígado da PTEN, um regulador negativo da via *phosphatidylinositol* 3-kinase/Akt, induz a esteatose com concomitante hipersensibilidade a insulina (HORIE et al., 2004; STILES et al., 2004). Além dos sinais atuais de esteatose, observou-se anteriormente um aumento na regulação na via de sinalização da insulina em resposta ao protocolo de OTR/*down* (ROCHA et al., 2015). Assim, o próximo passo do nosso laboratório de pesquisa será investigar os efeitos desse modelo específico de OT nos níveis protéicos da PTEN.

Além disso, VINCIGUERRA et al., (2008) verificaram que ácidos graxos insaturados estimulam a fosforilação da mTOR em complexo com o *factor* nuclear kappa B (NFκB p65). A fosforilação do NFκB p65 leva a dissociação do complexo mTOR/NFκB p65 e sua translocação para o núcleo, aonde induz a menor atividade da proteína PTEN. Interessantemente, nos observamos anteriormente um aumento do *IκB kinase alpha and beta* (IKKalpha/beta) e do *stress-activated protein kinases/Jun amino-terminal kinases* (SAPK-JNK), que são capazes de modular o conteúdo nuclear de NFκB p65 (ASRIH; JORNAYVAZ, 2013), no fígado após o protocolo de OTR/*down* (ROCHA et al., 2015).

A *glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK-3beta), outra proteína chave da Akt, medeia a degradação proteossômica do mSREBP-1 (SUNDQVIST et al., 2005). CALVISI et al., (2011b) estudaram o papel da lipogênese na patogênese do carcinoma hepatocelular humano e verificaram que a GSK-3beta foi quase exclusivamente inativada/fosforilada. Recentemente, ROCHA et al., (2015) demonstraram que a fosforilação da GSK-3beta hepática (Ser09) foi

aumentada após o protocolo de OTR/*down* quando comparada com os outros grupos experimentais em resposta a estimulação de insulina. Portanto, é possível considerar que a maior ativação da GSK-3beta hepática contribuiu para os sinais de esteatose observadas no grupo de OTR/*down*.

Exceto pela maior ativação da SREBP-1 (p125 precursor) no grupo OTR/*up*, outras proteínas não foram moduladas após os protocolos de OTR/*up* e OTR. O aumento do SREBP-1 (p125 precursor), em resposta ao protocolo OTR/*up* pode ser parcialmente relacionada aos níveis hepáticos elevados de pAkt (Ser473) e pGSK-3beta (Ser09) que foram exibidos por este grupo, em particular depois da estimulação de insulina. As análises histológicas revelam que os grupos OTR/*up* e OTR apresentaram hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos e núcleos picnóticos. Essas alterações morfológicas sugerem uma adaptação patológica aguda; entretanto, nós não observamos um aumento na atividade de citocinas pró inflamatórias, pIKKalpha/beta e pSAPK-JNK no fígado de camundongos C57BL/6 após esse modelo de OT (ROCHA et al., 2015).

Em resumo, o *overtraining* induzido pelo modelo de corrida em declive aumentou a maioria das proteínas da via de sinalização da mTOR no fígado de camundongos mesmo com os níveis elevados de pAMPK (Thr172). Além disso, esse protocolo de OT aumentou os níveis proteicos de SREBP-1 (p125 precursor) e induziu a sinais de esteatose hepática com inchaço celular acompanhado de inflamação aguda. Os outros dois protocolos de OT, realizados em aclone e sem inclinação não modularam a maioria das proteínas analisadas, mas induziram a alterações morfológicas hepáticas sugerindo uma adaptação patológica aguda. Estes dados reforçam que o fígado deve ser investigado mais a fundo em estados de NFOR.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. et al. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. **Motriz**, v. 9, n. 2, p. 87–92, 2003.
- ARMSTRONG, R. B. Muscle damage and endurance events. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 3, n. 5, p. 370–381, 1986.
- ASRIH, M.; JORNAYVAZ, F. R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **The Journal of endocrinology**, v. 218, n. 3, p. R25–36, 2013.
- BAKAN, I.; LAPLANTE, M. Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. **Current Opinion in Lipidology**, v. 23, p. 226–234, 2012.
- BARRON, J. L. et al. Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 60, n. 4, p. 803–6, 1985.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 331–340, 1997.
- CALVISI, D. F. et al. Promotes Development of Human Hepatocellular Carcinoma. p. 1071–1083, 2011a.
- CALVISI, D. F. et al. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 1071–1083, 2011b.
- CARLSON, C. L.; WINDER, W. W. Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. **J Appl Physiol**, v. 86, n. 2, p. 669–674, 1999.
- CINTRA, D. E. et al. Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: The role of sterol regulatory element-binding protein-1c. **Life Sciences**, v. 91, n. 11-12, p. 395–401, 2012.
- DAVIS, J. M. et al. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 292, n. 6, p. R2168–R2173, jun. 2007.
- DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 239–252, 2000.
- DELDICQUE, L.; THEISEN, D.; FRANCAUX, M. Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 1-2, p. 1–10, 2005.

DEVOL, D. L. et al. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. **The American journal of physiology**, v. 259, n. 1 Pt 1, p. E89–95, 1990.

DÜVEL, K. et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. **Molecular Cell**, v. 39, n. 2, p. 171–183, 2010.

FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 12 Suppl 2, n. figure 1, p. 83–92, 2010.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–5, ago. 2007.

FRYER, L. G. D. et al. Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. **The Biochemical journal**, v. 363, n. Pt 1, p. 167–174, 2002.

FUJITA, S. et al. Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 103, n. 3, p. 903–10, 2007.

GOODMAN, C. A et al. Smad3 induces atrogen-1, inhibits mTOR and protein synthesis, and promotes muscle atrophy in vivo. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 27, n. 11, p. 1946–57, 2013.

HARDIE, D. G. Minireview: The AMP-Activated Protein Kinase Cascade: The Key Sensor of Cellular Energy Status. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5179–5183, 2003.

HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? **Eur.J Biochem.**, v. 246, n. 2, p. 259–273, 1997.

HOENE, M.; WEIGERT, C. The stress response of the liver to physical exercise. **Exercise immunology review**, v. 16, p. 163–83, 2010.

HORIE, Y. et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 12, p. 1774–1783, 2004.

HORNBERGER, T. A. et al. mTOR is the rapamycin-sensitive kinase that confers mechanically-induced phosphorylation of the hydrophobic motif site Thr(389) in p70(S6k). **FEBS letters**, v. 581, n. 24, p. 4562–6, 2007.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125–1131, 2002.

KENTTÄ, G.; HASSMÉN, P.; RAGLIN, J. S. Training practices and overtraining syndrome in Swedish age-group athletes. **International journal of sports medicine**, v. 22, n. 6, p. 460–

5, 2001.

KOHJIMA, M. et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 507–511, 2008.

KREHER, J. B.; SCHWARTZ, J. B. Overtraining Syndrome: A Practical Guide. **Sports Health: A Multidisciplinary Approach**, v. 4, n. 2, p. 128–138, 2012.

KUIPERS, H. et al. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. **International journal of sports medicine**, v. 6, n. 4, p. 197–201, 1985.

LÉGER, B. et al. Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogen-1. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 3, p. 583–585, 2006.

LEHMANN, M. et al. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 30, n. 7, p. 1140–1145, 1998.

LI, S. et al. Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, n. 2, p. 197–202, 2011.

LI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 8, p. 3441–3446, 2010.

LIRA, F. S. et al. Exercise intensity modulation of hepatic lipid metabolism. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, p. 809576, 2012.

LUEPKER, R. V et al. Outcomes of a field trial to improve children's dietary patterns and physical activity. The Child and Adolescent Trial for Cardiovascular Health. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 275, n. 10, p. 768–776, 1996.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 5, p. 307–318, 2009.

MARINHO, R. et al. Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and protein kinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 12, n. 1, p. 82–89, 2014.

MEEUSEN, R. 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. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 1, p. 186–205, 2013.

MORENO, H. et al. Differential Regulation of the Muscle-specific GLUT4 Enhancer in Regenerating and Adult Skeletal Muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 40557–40564, 2003.

NEWTON, R. U.; GALVÃO, D. A. Exercise in prevention and management of cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 9, n. 2-3, p. 135–146, 2008.

- OZCAN, U. et al. Loss of the Tuberous Sclerosis Complex Tumor Suppressors Triggers the Unfolded Protein Response to Regulate Insulin Signaling and Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 29, n. 5, p. 541–551, 2008.
- PARKINGTON, J. D. et al. Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 285, p. R1086–R1090, 2003.
- PEREIRA, B. C. et al. 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.
- PEREIRA, B. C. et al. Overtraining is associated with DNA damage in blood and skeletal muscle cells of Swiss mice. **BMC physiology**, v. 13, n. 1, p. 11, 2013.
- PEREIRA, B. C. et al. Nonfunctional overreaching leads to inflammation and myostatin upregulation in swiss mice. **International Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 2, p. 139–146, 2014a.
- PEREIRA, B. C. et al. Eccentric exercise leads to performance decrease and insulin signaling impairment. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 46, n. 4, p. 686–694, 2014b.
- PEREIRA, B. C. et al. Excessive eccentric exercise leads to transitory hypothalamic inflammation, which may contribute to the low body weight gain and food intake in overtrained mice. **Neuroscience**, v. 311, p. 231–242, 2015.
- PERSEGHIN, G. et al. Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 683–688, 2007.
- PETERSON, T. R. et al. MTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the srebp pathway. **Cell**, v. 146, n. 3, p. 408–420, 2011.
- POLAK, P.; HALL, M. N. mTOR and the control of whole body metabolism. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 2, p. 209–18, 2009.
- POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Exercise Physiology: Theory and Application to Fitness and Performance**. [s.l: s.n.]. v. 4th
- QUAN, H. Y. et al. Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK-mTOR-SREBP signaling pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1330–1340, 2013.
- RABØL, R. et al. Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 33, p. 13705–13709, 2011.
- RADZIUK, J.; PYE, S. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 17, n. 4, p. 250–72, 2001.

RECTOR, R. S. et al. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 294, n. 3, p. G619–26, 2008.

RIBAU, P. G.; IYNEDJIAN, P. B. Analysis of the role of protein kinase B (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) mRNAs in hepatocytes. **Biochem J**, v. 376, n. Pt 3, p. 697–705, 2003.

ROBSON, P. J. Elucidating the unexplained underperformance syndrome in endurance athletes: The interleukin-6 hypothesis. **Sports Medicine**, v. 33, n. 10, p. 771–781, 2003.

ROCHA, A. L. DA et al. Downhill Running-Based Overtraining Protocol Improves Hepatic Insulin Signaling Pathway without Concomitant Decrease of Inflammatory Proteins. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. e0140020, 2015.

ROGERO, M. M.; MENDES, R. R.; TIRAPAGUI, J. Aspectos neuroendócrinos e nutricionais em atletas com overtraining. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 3, p. 359–368, 2005.

ROSCHER, H.; TRICOLLI, V.; UGRINOWITSCH, C. Treinamento físico: considerações práticas e científicas. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 25, n. Esp, p. p53–65, 2011.

RUDERMAN, N. B. et al. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 178, n. 4, p. 435–42, 2003.

SCHULTZE, S. M. The role of systemically perturbed PTEN and PKB β / AKT2 signaling in accumulation of hepatic lipids. 2013.

SIMPSON, R. J. et al. Exercise and the aging immune system. **Ageing Research Reviews**, v. 11, n. 3, p. 404–420, 2012.

SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, n. 2, p. 317–31, 2000.

STEINACKER, J. M. et al. New aspects of the hormone and cytokine response to training. **European Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 4, p. 382–391, 2004.

STILES, B. et al. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 2082–2087, 2004.

STOECKMAN, A. K.; TOWLE, H. C. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 30, p. 27029–27035, 2002.

SUNDQVIST, A. et al. Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCFFbw7. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 6, p. 379–391, 2005.

- TURGEMAN, T. et al. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, n. 11, p. 857–868, 2008.
- UM, S. H. et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 200–205, 2004.
- VIÑA, J. et al. Exercise acts as a drug; The pharmacological benefits of exercise. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 1, p. 1–12, 2012.
- VINCIGUERRA, M. et al. PTEN Down-Regulation by Unsaturated Fatty Acids Triggers Hepatic Steatosis via an NF- κ Bp65/mTOR-Dependent Mechanism. **Gastroenterology**, v. 134, n. 1, p. 268–280, 2008.
- WANG, X.; PROUD, C. G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 21, p. 362–9, 2006.
- WINDER, W. W.; BEATTIE, M. A.; FULLER, E. O. Glycogenolytic rates and cAMP in livers of rats running at different treadmill speeds. **The American Journal of Physiology**, v. 245, n. 3, p. R353–6, 1983.
- WITTERS, L. A. et al. Hepatic 5'-AMP-activated protein kinase: zonal distribution and relationship to acetyl-CoA carboxylase activity in varying nutritional states. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 308, n. 2, p. 413–9, 1994.
- YAHAGI, N. Absence of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 (SREBP-1) Ameliorates Fatty Livers but Not Obesity or Insulin Resistance in Lepob/Lepob Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19353–19357, 2002.
- YAMADA, A. K.; VERLENGIA, R.; BUENO JUNIOR, C. R. Mechanotransduction pathways in skeletal muscle hypertrophy. **Journal of receptor and signal transduction research**, v. 32, n. 1, p. 42–4, 2012.
- YECIES, J. L. et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. **Cell Metab**, v. 14, n. 1, p. 21–32, 2011.
- YELLATURU, C. R. et al. Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 12, p. 7518–7532, 2009.
- ZHOU, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167–74, 2001.