Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2017

Efeitos do *overreaching* não funcional
na via de sinalização insulínica do tecido
cardíaco de camundongos

PPGRDF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FUNCIONAL
FMRP-USP

Luciana da Costa Oliveira

Dissertação

LUCIANA DA COSTA OLIVEIRA

**EFEITOS DO *OVERREACHING* NÃO FUNCIONAL NA VIA DE
SINALIZAÇÃO INSULÍNICA DO TECIDO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Sanchez
Ramos da Silva

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

Oliveira, Luciana da Costa

Efeitos do *overreaching* não funcional na via de sinalização insulínica do tecido cardíaco de camundongos, 2017.

60p . : il. ; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Da Silva, Adelino Sanchez Ramos.

1.Inflamação 2.Miocárdio 3.Overreaching não funcional 4.Via de sinalização insulínica

Nome: OLIVEIRA, Luciana da Costa

Título: Efeitos do *overreaching* não funcional na via de sinalização insulínica do tecido cardíaco de camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Data:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

RESUMO

OLIVEIRA, LC. Efeitos do *overreaching* não funcional na via de sinalização insulínica do tecido cardíaco de camundongos. 2017. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O *overreaching* não funcional (NFOR) induzido por consecutivas sessões de treinamentos intensos intercaladas por períodos insuficientes de recuperação, está associado com inflamação e consequente prejuízo da via de sinalização insulínica em músculos esqueléticos de camundongos. Sabe-se que o miocárdio também é capaz de produzir tais proteínas inflamatórias associadas ao comprometimento da via hormonal e que alterações na atividade do receptor insulínico cardíaco levam à forçadas modificações na utilização dos substratos energéticos com prejuízos na mecanoenergética cardíaca predispondo o miocárdio à diversas injúrias. No entanto os efeitos do NFOR nas vias inflamatórias e insulínica cardíaca ainda não foram investigados. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do NFOR no conteúdo de glicogênio cardíaco e ativação de proteínas relacionadas às vias insulínica e inflamatória. Os animais foram divididos em 6 grupos: Naive, Controle, Treinado, e os grupos submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive (OTR/down), aclone (OTR/up) e sem inclinação (OTR). As especificidades das contrações musculares induziram diferentes adaptações cardíacas. Os grupos OTR e OTR/up não apresentaram sinais de inflamação além de superexpressarem a via insulínica, por outro lado, o grupo OTR/down apresentou inflamação cardíaca de baixo grau, contudo, sem queda no conteúdo de pIR. Todos os protocolos de *overtraining* induziram elevação no conteúdo de glicogênio cardíaco acompanhado de expressiva queda da pAMPK. Os resultados do presente trabalho nos trazem, portanto, a hipótese de que o tecido cardíaco apresente uma maior resistência à inflamação viabilizando dessa forma a melhora da resposta insulínica e acúmulo do glicogênio cardíaco a fim de fornecer a energia necessária ao extenuante exercício físico evitando a lipotoxicidade cardíaca. Por outro lado, a queda da AMPK consequente do excessivo acúmulo de glicogênio cardíaco pode predispor o miocárdio à diversas injúrias, sendo necessários mais estudos na área.

Palavras-chave: inflamação, miocárdio, *overreaching* não funcional, via de sinalização da insulínica.

ABSTRACT

OLIVEIRA, LC. Effects of non-functional *overreaching* on the insulin signaling pathway of mouse cardiac tissue. 2017. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Non-functional overreaching (NFOR) induced by consecutive intense training sessions interspersed by insufficient periods of recovery is associated with inflammation and a consequent impairment of the insulin signaling pathway in skeletal muscle of mice. It is known that the myocardium is also capable of producing such inflammatory proteins associated with the impairment of the hormonal pathway and that changes in cardiac insulin receptor activity lead to forced modifications in the use of energetic substrates with losses in cardiac mecanoenergética predisposing the myocardium to various injuries. However, the effects of NFOR on inflammatory and cardiac insulin pathways have not been investigated yet. Thus, the present study aims to evaluate the effects of NFOR on cardiac glycogen content and activation of proteins related to insulin and inflammatory pathways. The animals were divided into 6 groups: Naïve, Control, Trained, and the groups submitted to the overtraining protocol in decline (OTR/down), uphill (OTR /up) and without inclination (OTR). The specificities of muscle contractions induced different cardiac adaptations. OTR and OTR/up groups showed no signs of inflammation and an over expressive of the insulin pathway; on the other hand, the OTR/down group presented low-grade cardiac inflammation, however, without any decrease in the pIR content. All overtraining protocols induced elevation in cardiac glycogen content accompanied by significant drop in pAMPK. The results of the present work hypothesize that the cardiac tissue presents a greater resistance to inflammation, thus enabling the improvement of the insulin response and the accumulation of cardiac glycogen in order to provide the necessary energy to the strenuous physical exercise avoiding cardiac lipotoxicity. On the other hand, the decrease in AMPK due to the excessive accumulation of cardiac glycogen may predispose the myocardium to several injuries, and further studies in the area are required.

Key words: inflammation, insulin signaling pathway, myocardium, nonfunctional overreaching.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo de treinamento.....	24
Tabela 2 - Protocolo de <i>overtraining</i> em declive.....	24
Tabela 3 - Protocolo de <i>overtraining</i> em aclone.....	25
Tabela 4 - Protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação.....	25
Tabela 5 - Disciplinas concluídas para cumprimento dos créditos exigidos no programa de pós graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional.....	48
Tabela 6 - Cronograma do mini curso de Capacitação em Biologia Molecular e Excesso de Treinamento.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desempenho nos testes físicos nas semanas zero, quatro e oito dos grupos, Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em ativo) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. A) Teste de Força e Preensão; B) Teste do Rotarod; C) Teste Exaustivo; D) Teste de carga incremental. * $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo em relação à semana quatro. ** $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo em relação à semana zero. + $P < 0,05$ vs. OTR/down na mesma semana. ++ $P < 0,05$ vs. TR na mesma semana. # $P < 0,05$ vs. Controle na mesma semana.....

30

Figura 2. A) Avaliação da ingestão alimentar ao longo do experimento dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em ativo) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ vs. treinado dentro da mesma semana. + $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo com a semana zero. B) **Avaliação da massa corporal ao longo do experimento dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em ativo) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação).** + $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo com a semana zero. * $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo em relação a semana quatro.....

32

Figura 3. Avaliação das proteínas inflamatórias cardíacas dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em ativo) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Níveis proteicos (unidades arbitrárias), de IL1-beta (3.A), IL-6 (3.B), pIKK alpha-beta(ser180/181)/IKK (3.C), pIRS-1(ser307)/IRS-1 (3.D), P-p38MAPK (tre180/tir182)/p38MAPK (3.E), pSAPK/JNK(tre83-185)/SAPK/JNK (3.F), e TNF-alfa (3G). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ vs. Naive. ** $P < 0,05$ vs. Controle.....

33

Figura 4. Avaliação da via insulínica no tecido cardíaco de Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em ativo) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Níveis proteicos (unidades arbitrárias), de pAkt(ser407)/Akt (4.A), e pIRbeta(Tyr)/IRbeta (4.B). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ vs. Naive. ** $P < 0,05$ vs. Controle. + $P < 0,05$ vs. OTR/down.....

35

Figura 5. Proteínas insulino independentes potencialmente estimuladoras do transportador de glicose, GLUT4, no tecido cardíaco dos grupos, Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em ativo) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de pAMPK(Tre172)/AMPK (5.A), PGC1-alfa/beta actina (5.B). * $P < 0,05$ vs. Treinado.....

35

Figura 6. Avaliação dos Transportadores de glicose cardíacos nos grupos

Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de <i>overtraining</i> em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de <i>overtraining</i> em aclave) e OTR (submetidos ao protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação). Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de GLUT1 de membrana/GLUT1 total (6.A), GLUT4 de membrana/GLUT4 total (6.B). Cada coluna representa a média ± erro padrão. * P<0,05 vs. Naive. ** P<0,05 vs. Controle. + P<0,05 vs. OTR/down. ++ P<0,05 vs. OTR/up.....	36
Figura 7. Avaliação da sensibilidade à insulina e conteúdo de glicogênio cardíaco dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de <i>overtraining</i> em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de <i>overtraining</i> em aclave) e OTR (submetidos ao protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação). Área sobre a curva (AUC; mg.dL⁻¹ × min) da resposta glicêmica do tempo 0 ao 30 após a injeção intraperitoneal de insulina (1.0 U.kg⁻¹) (7.A), e correspondente resposta glicêmica ao longo de 30 minutos (7.B); concentração de glicogênio cardíaco em mg.100mg⁻¹ de tecido (7.C).Cada coluna representa a média ± erro padrão.....	37
Figura 8. Caracterização histológica (x400) ventricular por ácido periódico de Schiff (8.A) e gráfico correspondente a quantificação (8.B).....	38

EPÍGRAFE

A pirâmide da alma

Torça para que sua mente esbarre em adversidades
Torça para que o esbarrão toque a alma
Para que a alma transcenda-se
Para que se torne humilde
Cheia de subjetividades
Expansionista
Infinita
...

Luciana da Costa Oliveira

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me proporcionar essa jornada cheia de desafios, mas também repleta de oportunidades.

Ao meu querido professor orientador; Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva, por acreditar em mim e me abrir estas portas que mudaram para sempre, e para melhor, o rumo de minha vida. Agradeço a Deus pela sorte de cruzar seu caminho, e poder fazer parte de sua admirável equipe. Obrigada!

Aos meus amigos do laboratório pelo apoio nos experimentos do dia a dia, inclusive aos finais de semana, feriados, férias, e madrugadas, agradeço esse inestimável companheirismo. A Ana Paula Pinto, pela sinceridade, pelas críticas construtivas, e pelo admirável exemplo de organização e presteza. Ao Alisson Luiz da Rocha, pelo seu brilhantismo notável, e disposição em ajudar sempre, exemplo a ser espelhado. Ao meu especial companheiro Gustavo Paroschi Moraes, pelo amável carinho de sempre, pela essencial ajuda e compreensão, e por me inspirar nos momentos difíceis tornando mais leve essa jornada. Vocês foram imprescindíveis para o aprimoramento e conclusão desse trabalho.

Ao meu pai, meu anjo, José Arimatéia de Oliveira, que na saudade deixa amor, admiráveis lembranças que trazem do passado para o futuro, exemplos eternos de sabedoria que se transcendem em sinais de força e coragem. Obrigada por me fortalecer sempre!

A minha amada mãe, Jucélia Venâncio da Costa Oliveira, mãe incondicional, tenho por você, um agradecimento indescritível.

Aos meus amados irmãos, Lucas da Costa Oliveira e Cristina da Costa Oliveira, por sempre me reanimarem com o exemplo de suas dedicações e perseverança.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro à nossa equipe.

Aos estimados professores doutores que trabalham no aprimoramento de projetos científicos, participam de bancas, e, sobretudo, que acolhem esse árduo trabalho por nada mais que esplêndida sabedoria e amor à ciência. Obrigada por tornarem possíveis as pesquisas públicas.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt/PKB - proteína quinase

AMP - adenosina monofosfato

AMPK - proteína quinase 5-AMP

ATP - trifosfato de adenosina

FOR - *overreaching* funcional

GLUT4 - transportador de glicose tipo 4

GSK3- glicogênio sintase quinase 3

IκB – *Inhibitor of kappa B*

IKK – IκB *Kinase*

IL6 - interleucina 6

IL1-beta - interleucina 1 beta

IR - receptor de insulina

IRS - substrato do receptor de insulina

ITT - avaliação da tolerância intraperitoneal à insulina

JNK - *Jun amino-terminal Kinases*

p38MAPK - proteínas quinases ativadas por mitógeno

NFOR - *overreaching* não funcional

OR - *overreaching*

OT - *overtraining*

OTS - síndrome do *overtraining*

PGC1-alfa - *proliferator-activated receptor – coactivator 1*

Pi3K – Fosfoinosítídeo 3-quinase

S6K1 - *ribosomal protein S6 kinase 1*

SAPK - *stress-activated protein kinases*

SOCS3 - supressor de sinalização de citocina 3

TNF-alfa - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2	OBJETIVO.....	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Animais expererimentais.....	23
3.2	Teste de carga incremental.....	23
3.3	Protocolo de treinamento (TR).....	23
3.4	Protocolo de <i>overtraining</i> em declive (OTR/down).....	24
3.5	Protocolo de <i>overtraining</i> em alicve (OTR/up).....	24
3.6	Protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação (OTR).....	25
3.7	Avaliação do desempenho físico.....	25
3.7.1	<i>Teste de rotarod.....</i>	<i>26</i>
3.7.2	<i>Teste exaustivo.....</i>	<i>26</i>
3.7.3	<i>Teste de força de preensão.....</i>	<i>26</i>
3.8	Avaliação de parâmetros metabólicos.....	26
3.9	Extração do músculo cardíaco	27
3.10	Determinação do conteúdo proteico na membrana plasmática	27
3.11	<i>Immunoblotting</i>	<i>27</i>
3.12	Avaliação da tolerância intraperitoneal à insulina (ITT).....	28
3.13	Determinação do glicogênio Muscular.....	29
4	ANÁLISE DE RESULTADOS.....	29
5	RESULTADOS.....	30
5.1	Desempenho físico.....	30
5.2	Ingestão alimentar e massa corporal.....	31
5.3	Resposta inflamatória e via insulínica molecular.....	32
5.4	Teste de tolerância à insulina (ITT) e glicogênio cardíaco.....	36
6	DISCUSSÃO.....	39
6.1	Inflamação, especificidade do exercício e efeitos no desempenho físico....	39
6.2	Inflamação, especificidade do exercício e efeitos na ingestão alimentar e massa corporal.....	41
6.3	Inflamação, especificidade do exercício e via insulínica cardíaca.....	42
7	CONCLUSÃO.....	47
8	RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	48
	REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Atletas de elite lidam rotineiramente com os limites de suas habilidades físicas visando à maximização do desempenho através da periodização do treinamento, com alternância entre sessões de exercício intenso e períodos de recuperação¹. A melhora do desempenho resultante do treinamento proposto deve-se às adaptações fisiológicas em diversos tecidos, inclusive no sistema cardiovascular, que aprimora sua capacidade de bombeamento otimizando o transporte de oxigênio e nutrientes para os músculos em atividade^{2; 3; 4}. O processo fisiológico adaptativo decorrente da intensificação da carga de treinamento naturalmente envolve fadiga aguda por um curto período após o exercício, contudo, quando frequentemente desprezado o tempo necessário para a recuperação desse estado e mantidos consecutivos treinos de carga elevada, o atleta pode apresentar um desequilíbrio fisiológico que o predispõe à fadiga crônica e desenvolvimento do *overreaching* (OR), definido como acúmulo de estresse proveniente do treinamento e/ou de situações extratreinamento que resultam na diminuição do desempenho esportivo durante dias a meses, podendo ou não estar associado a sintomas fisiológicos e psicológicos⁵.

Várias terminologias são utilizadas na literatura referindo-se ao *overreaching* e suas derivações, como *overwork*, *staleness*, *overfatigue*, *overstress*,⁵ entre outros, sendo assim, recentemente pesquisadores da *American College of Sports Medicine* (ACSM) e do *European College of Sport Science* (ECSS), publicaram um artigo de revisão almejando um consenso entre terminologias e diagnósticos⁶. Segundo MEEUSEN e colaboradores (2013)^{6; 7}, o *overreaching* pode ser classificado em *overreaching* funcional (FOR) ou *overreaching* não funcional (NFOR); sendo o primeiro definido como uma queda temporária do desempenho não relacionada a distúrbios psicológicos e/ou fisiológicos podendo ser revertida após um breve período de recuperação, e, após o devido descanso, o atleta apresenta o fenômeno da supercompensação, que corresponde a uma elevação do nível de desempenho quando comparado ao nível inicial como uma resposta fisiológica compensatória aos estresses induzidos pela intensificação dos treinos⁸. Contudo, se mantido o aumento da carga do treinamento com desrespeito ao período adequado de recuperação, o atleta pode desenvolver o *overreaching* não funcional, caracterizado por estagnação ou declínio do desempenho físico que pode ser revertido após semanas ou meses de recuperação, e está associado com alterações psíquicas e hormonais, sem a presença do fenômeno da supercompensação. Mantendo-

se ainda a cronicidade desse treinamento intenso acompanhado de descansos escassos, pode ocorrer agravamento do quadro e a indução da síndrome do *overtraining* (OTS), classificada como a queda do desempenho associada a alterações de humor e no sistema neuroendócrino, podendo ser necessários meses ou até anos para sua reversão. O padrão ouro para detecção tanto do NFOR quanto da OTS é a manutenção da queda da *performance* mesmo após semanas de recuperação, e às semelhanças entre sinais e sintomas torna complexa a distinção entre ambos, contudo, o diagnóstico da síndrome exige um estado prolongado de má adaptação associado à desregulação dos sistemas biológicos, hormonais e neuroquímicos⁷.

Apesar da queda ou estagnação do desempenho ser muito comum em atletas, há uma escassez de estudos que informam dados sobre a prevalência e incidência do NFOR/OTS⁹, sendo sugerido que a até então não definição das terminologias e a complexidade do diagnóstico seria um fator limitante para essa questão⁸. Um estudo de Birrer e colaboradores (2013)⁹, no qual foram avaliados 139 atletas de elite, de diferentes modalidades, identificou que 9% dos atletas apresentaram a síndrome do *overtraining*, e 21% apresentaram NFOR pelo menos uma vez em sua carreira. Outro estudo longitudinal¹⁰, avaliando o desempenho físico de nadadores britânicos, identificou que 29% dos atletas apresentaram NFOR ou OTS ao menos uma vez¹⁰. Já avaliando corredores profissionais¹¹, verificou-se¹¹ um percentual mais alto de incidências, sendo evidenciado que 60% dos atletas de ambos os sexos apresentaram NFOR em algum momento das temporadas. Estudos ressaltam ainda elevados índices de reincidências, como identificado por Raglin e colaboradores¹², que encontraram um novo diagnóstico de OTS em 91% dos nadadores universitários avaliados dentro de três anos após o primeiro episódio da síndrome.

Apesar de ainda não bem esclarecida, distintos estudos analisam as possíveis etiologias indutoras do NFOR e OTS, dentre estes, Snyder e colaboradores¹³, propõem a hipótese dos carboidratos, na qual a alta demanda energética associada às elevadas cargas de treinamento induziriam uma esperada depleção aguda dos estoques de glicogênio muscular, contudo, após consecutivas sessões de treinamento intenso paralelas a curtos períodos de descanso, se instalaria um quadro de insuficiente reposição glicídica provocando assim uma deficiência de glicogênio crônica com consequente limitação do fluxo metabólico glicolítico na geração de energia, limitando as vias de formação de adenosina trifosfato (ATP) e predispondo à fadiga muscular crônica. Estudos que identificam frequentes quadros de hipoglicemia provocados pela

prática de exercícios em atletas em OTS¹⁴, corroboram com a hipótese, e discutem ainda a dificuldade dos esportistas alcançarem a ingestão calórica adequada, principalmente provenientes de hidratos de carbono, capaz de suprir a demanda energética imposta pela periodização do treinamento, e também da identificação do tempo de descanso necessário para reposição do mesmo^{15;13}.

Outra hipótese etiológica publicada em 1999 e cientificamente mais difundida foi proposta por Smith¹⁶ que sugere que os traumas teciduais musculares e esqueléticos provocados pela alta carga de treinamento com descanso insuficiente, seriam os iniciadores da OTS. O microtrauma local agudo, naturalmente associado ao exercício, evoluiria progressivamente a uma injúria subclínica, as citocinas liberadas ativariam a circulação de monócitos com exacerbação da inflamação local a uma inflamação crônica sistêmica com interações diversas, como comunicação com o sistema nervoso central e indução de alterações patológicas de humor, impacto no sistema imune, alterações na gliconeogênese hepática, e inclusive, posteriores limitações também na via glicolítica muscular esquelética¹⁷, associadas com os sinais e sintomas diversos da síndrome.

Sabendo-se que o NFOR provoca a queda do desempenho, e a indução proposital do mesmo em atletas levaria, portanto, a prejuízos nas competições e em suas carreiras, a Sociedade Americana de Fisiologia incentiva à utilização de modelos experimentais para estudos na área^{8; 18}. Recentemente, Pereira e colaboradores desenvolveram um protocolo de OT baseado em sessões crônicas de corrida em declive capaz de induzir o NFOR em 100% dos camundongos¹⁹. Posteriormente²⁰, objetivando analisar a relação da queda do desempenho induzida pelo protocolo e as respostas das vias moleculares inflamatórias, os pesquisadores verificaram que os camundongos em NFOR apresentaram inflamação crônica de baixa intensidade tanto em músculos esqueléticos [elevação da concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), e de interleucina 6 (IL-6)], quanto em soro (elevação do conteúdo de IL-6), além de altas concentrações de miostatina no músculo esquelético; corroborando com a hipótese do papel central das citocinas proposta por Smith¹⁶.

Em outro estudo¹⁷, observou-se ainda que o protocolo de OT baseado em sessões em declive foi capaz de modular o conteúdo proteico e a fosforilação de moléculas envolvidas na transdução do sinal insulínico, com diminuição do substrato do receptor de insulina beta (IRbeta; pIRbeta) e proteína quinase B (Akt;pAkt); e concomitante aumento na fosforilação do receptor de insulina 1 em serina (IRS-1, Ser307); proteína

quinase IκB (IKK), supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3) e a SAPK/JNK (*the stress-activated protein kinases/Jun amino-terminal Kinases*), integrante da família das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), levando à prejuízos na via de sinalização insulínica no músculo extensor longo dos dedos (EDL) e no sóleo. Assim como o músculo esquelético, sabe-se que o miocárdio também é capaz de produzir proteínas pró-inflamatórias IKK e SAPK/JNK, além de IL-6, TNF-alfa e interleucina 1-beta (IL-1beta), associadas com o comprometimento da via de sinalização insulínica cardíaca^{21; 22; 23}. Entretanto, apesar de Smith¹⁶ e outros autores^{24,20; 25}, identificarem intensificação da reposta inflamatória no tecido muscular esquelético, hepático, e hipotálamo, além de valores séricos elevados de citocinas, o efeito da OTS nas respostas moleculares cardíacas ainda não foi verificado, não sendo portanto possível afirmar se o coração seria acometido por semelhante estado inflamatório em respostas ao NFOR.

Em um programa de treinamento aeróbico, as adaptações cardíacas em resposta a dinâmica do exercício envolvem uma série de ajustes cardiovasculares com melhora do débito cardíaco (volume de sangue bombeado por minuto) com o intuito de proporcionar com mais eficiência o aporte de oxigênio necessário ao músculo esquelético em atividade, estando o coração, portanto, estritamente relacionado com a determinação do consumo máximo de oxigênio (Vo2max), desempenhando dessa forma um papel crucial não só na evolução na prescrição da carga adequada de treinamento (realizada a partir do Vo2max), quanto melhora da *performance*^{2; 26}.

O miocárdio apresenta uma abundante e contínua demanda energética visando sustentar a manutenção da homeostase iônica e contratilidade²⁷. Em condições fisiológicas, tal demanda é suprida por substratos diversos como glicose, lactato, piruvato, corpos cetônicos, aminoácidos e ácidos graxos, sendo, este último, responsável por aproximadamente 70% da produção de adenosina trifosfato (ATP) requerida²⁸. Contudo, em situações em que há elevação da demanda energética e aumento da frequência cardíaca, como no exercício físico, a relação da dependência de energia proveniente dos ácidos graxos é forçada a reduzir e o carboidrato se torna substrato crucial para o sustentamento da função tecidual normal^{29; 30}, elevando a eficiência cardíaca em até 30%³¹.

As adaptações moleculares cardíaca em reposta ao exercício crônico são decorrentes do aumento do conteúdo de proteínas relacionadas à melhora da capacidade respiratória mitocondrial e consequente geração de ATP, e aumento dos transportadores de glicose, aumentando assim a capacidade de utilização de hidratos de carbono,

resultando no aumento da eficiência da contração cardíaca^{3; 32} e do estoque de glicogênio no coração, implicando em um efeito cardioprotetor contra estresses³³.

A insulina desempenha um importante papel nessa regulação de substratos energéticos, participando tanto do estímulo do transporte glicídico quanto da captação de ácidos graxos de cadeia longa, além da síntese proteica, hipertrofia cardíaca e tonicidade vascular³⁴. Apesar de ter sido descoberta em 1921³⁵, a completa identificação da sinalização molecular insulínica ainda esta em progressão, contudo, sabe-se que o receptor de insulina (IR) é uma enzima tetramérica que compreende duas subunidades alfa extracelulares, e duas subunidades betas transmembrana. Uma vez ativado e fosforilado, os substratos gerados (família IRS), levam a ativação de sua via principal, a via Fosfoinosítídeo 3-quinase (Pi3K); uma quinase lipídica heterodimérica que se liga aos resíduos de tirosina pelo seu domínio SH2 gerando fosfatos PI de membrana com recrutamento da PkB/Akt que induzirá a translocação de transportadores glicídicos³⁶.

Há duas classes de transportadores de glicose, os cotransportadores sódio-glicose, e os transportadores de glicose transmembrana (GLUTs), sendo apenas esse último presente no tecido cardíaco. Os facilitadores de transporte glicídico apresentam sequências de aminoácidos em seus domínios citoplasmáticos responsáveis pelo controle da translocação dos GLUTs presentes nas vesículas intracelulares, para o sarcolema membranal e captação da glicose sérica³⁷.

Já foram identificadas trinta isoformas distintas de transportadores de glicose, divididas em três classes conforme suas propriedades cinéticas e regulatórias que refletem seu papel específico na homeostase glicêmica³⁶. Os transportadores de glicose já relatados no tecido cardíaco são os GLUT1, GLUT3, GLUT4, GLUT8 e GLUT12³⁸. Estudos com ratos *knockout*³⁹ de transportadores de glicose mostram que o GLUT4 é o primordial responsável pela captação de glicose nos cardiomiócitos, representando cerca de 60% do total de carreadores glicídicos⁴⁰, seguido pelo transportador insulino-independente GLUT1, representando quase os 40% dos carreadores restantes^{34; 40; 41}.

O remodelamento molecular cardíaco induzido pelo exercício de *endurance* é consequência, principalmente, da estimulação do transportador GLUT4^{42; 43}, e aumento do indutor da biogênese mitocondrial PGC1-alfa (*proliferator-activated receptor – coactivator 1*)⁴⁴. Em situações de stress energético, como no exercício físico, o GLUT4 se torna o principal contribuidor pela captação glicídica, sendo responsivo a fosforilação da AMPK^{45; 46; 47}, Akt (por mecanismo NO-dependente)⁴⁸ ao PGC1-alfa^{46; 48} e,

principalmente, ao estímulo insulínico^{31; 35; 39; 46}. A translocação insulino-dependente do GLUT4 é iniciada pela ligação do hormônio ao seu receptor IR, resultando na autofosforilação do receptor (IRSs serina/treonina) que inicia a cascata via Pi3K/Akt, induzindo a translocação do transportador⁴⁹.

Um estudo em humanos, visando avaliar a utilização de substratos energéticos pelo tecido cardíaco, através de fusão intravenosa de isótopos estáveis de carbono, verificou que durante o exercício moderado, a captação de glicose duplica quando comparado com o mesmo indivíduo no estado de repouso⁵⁰. Já em relação à avaliação das adaptações cardíacas a nível molecular, e portanto realizadas em estudos com modelo animal, CHOU e colaboradores⁴² avaliaram a interação entre o exercício físico no estoque de glicogênio e a expressão do GLUT4 no tecido cardíaco de ratos submetidos às sessões diárias de natação por um período de três horas durante quatro semanas, e constataram que o exercício físico elevou o estoque de glicogênio cardíaco em 45%, com paralelo aumento significativo do conteúdo de GLUT4. Vários estudos avaliam os efeitos das adaptações do miocárdio em resposta a treinos prolongados e de intensidades moderada e alta, porém, sabe-se que os efeitos do exercício físico no coração variam conforme a carga do treinamento⁵¹ e ainda não há relatos sobre a resposta da via insulínica cardíaca no treinamento extenuante (NFOR, OTS).

Apesar de a captação de glicose da corrente sanguínea pelos cardiomiócitos ser uma etapa limitada pela glicemia sérica, e pelos seus carreadores, principalmente o GLUT4⁵², sabe-se que em situações de exposição crônica a estímulos específicos o coração é capaz de sofrer adaptações metabólicas podendo ajustar-se através de distintas respostas. Um exemplo é o estudo recente de Waller e colaboradores³⁸, que observou que a limitação do sinal insulínico do miocárdio diabético levou a uma redução do conteúdo de GLUT4 em cerca de 40% quando comparado com o miocárdio sadio, contudo, apresentou também um significativo aumento de 250% do transportador de glicose insulino independente GLUT12. Diversos estudos identificam tal redução do conteúdo e/ou translocação do GLUT4 quando há deficiência do sinal insulínico cardíaco^{53; 54; 55; 56} e sabe-se ainda que outros estados fisiopatológicos associados à redução do conteúdo desse transportador, como isquemia e insuficiência cardíaca, apresentam como possível resposta compensatória, o concomitante aumento do transportador insulino independente GLUT1^{41; 57; 58}, dado que o comprometimento da via insulínica no miocárdio e sua consequente redução da taxa de oxidação de glicose com aumento da dependência do metabolismo lipídico⁵⁹ levam a alterações na homeostase

celular e forçadas modificações nas estruturas cardíaca⁶⁰ que são sugeridas como o princípio da fisiopatologia primária da cardiomiopatia diabética⁶¹. Apesar da recente evidência do *overreaching* não funcional ser capaz de elevar a fosforilação do IRS-1 em serina 307, limitando o sinal insulínico, além de ativar expressivamente proteínas inflamatórias (IKK e SAPK/JNK), prejudicando assim a translocação do GLUT4 para a superfície da membrana dos músculos esqueléticos⁶², ainda não é possível afirmar se tal limitação estaria presente também no miocárdio. Além disso, sabe-se que o coração apresenta maior conteúdo de GLUT4 que o músculo esquelético vermelho, seguido do músculo esquelético branco e tecido adiposo branco⁶³, não sendo possível relatar, qual seria a magnitude dos efeitos do NFOR no tecido cardíaco.

Por outro lado, a prática regular de exercício físico tem demonstrado relação direta com a melhora da sensibilidade insulínica em tecidos cardíacos. Um estudo avaliando o efeito do treinamento moderado de ratos corredores demonstrou que após dez semanas de treinamento, ratos diabéticos apresentaram significativo aumento do conteúdo de GLUT4 assim como da sua capacidade de translocação para a membrana⁵⁶. Outro estudo, utilizando-se do mesmo protocolo de treinamento, observou que ratas diabéticas apresentaram ainda uma redução do conteúdo do transportador GLUT1 ao final do experimento⁶⁴. Nesse contexto, um recente artigo de revisão⁵¹ aponta que, se por um lado o exercício aeróbico moderado e o treinamento intervalado de alta intensidade parecem ser benéficos na melhora da sensibilidade insulínica cardíaca, ambos otimizando captação glicídica⁶⁵, outros dados apontam que o exercício intenso parece provocar um abrandamento menos efetivo nas implicações cardiovasculares associadas a resistência insulínica, sugerindo portanto que as adaptações cardíacas apresentam estreita relação com a carga do treinamento, não havendo ainda dados sobre a via molecular insulínica no treinamento exaustivo, como o precursor do NFOR.

Dessa forma, diante da capacidade do tecido cardíaco de produzir citocinas pró-inflamatórias capazes de comprometer a via insulínica^{21; 22; 23}, é possível que o protocolo de OT provoque o comprometimento de tal via no tecido cardíaco assim como foi encontrado nos músculos soleo e gastrocnêmio¹⁷. Por outro lado, a melhora da capacidade da utilização de substratos energéticos glicídicos pode ocorrer devido ao efeito intrínseco do exercício físico, como resposta cardioprotetora à alta demanda energética requisitada no protocolo de OT^{29; 30}. Portanto, até o presente momento, não é possível determinar quais as adaptações no metabolismo energético dos cardiomiócitos frente ao NFOR, nem tanto afirmar a existência de desequilíbrio na homeostase

energética como os observados em tecidos cardíacos insulino-resistentes⁶¹ sugestivo de danos cardíacos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo geral comparar os efeitos dos protocolos de OT¹⁹ com um protocolo de treinamento de mesmo volume e intensidade¹, associado com melhora da performance^{17; 19; 20; 66}, nos parâmetros moleculares relacionados com as vias de sinalização insulínica e inflamatória no tecido cardíaco, e o desempenho físico de camundongos C57BL/6.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o peso corporal, ingestão alimentar e desempenho físico dos camundongos;
- Avaliar o conteúdo proteico e ativação das proteínas inflamatórias, IL-1beta, IL-6, IKKalfa/beta, pIRS-1(ser307), MAPK, SAPK/JNK e TNF-alfa no tecido cardíaco dos camundongos;
- Avaliar o conteúdo proteico e ativação dos transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT4), e de proteínas potencialmente estimuladoras da translocação (AMPK, Akt, IR, e PGC1-alfa,) em músculo cardíaco de camundongos;
- Investigar alterações glicêmicas em resposta ao ITT e mensurar o conteúdo do glicogênio cardíaco dos camundongos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados 104 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 sobre condições controladas de ciclo claro-escuro (12/12h), com livre acesso à água e ração convencional. Os camundongos foram divididos em 6 grupos: Naíve (N; n=14; sedentários), Controle (C; n=18; camundongos sedentários submetidos aos testes físicos), Treinados (TR; n=18; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; n=18; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em aclone (OTR/up; n=18; submetidos ao protocolo de *overtraining* em aclone), e *Overtraining* sem inclinação (OTR; n=18; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação)

3.2 Teste de carga incremental

Os animais foram adaptados ao exercício em esteira rolante durante 5 dias, 10min/dia na velocidade de 3m/min. Conforme padronizado por Ferreira e colaboradores¹, o teste de carga incremental foi iniciado 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. A potência máxima (Pmax), definida como a velocidade (m/min) de exaustão do animal, foi utilizada para a prescrição de intensidade nos protocolos de TR, OTR/down, OTR/up e OTR; ajuste da carga na semana 4 e avaliação na semana 8. A inclinação da esteira no teste de carga incremental foi compatível com a especificidade de cada grupo experimental, ou seja, OTR/down foi avaliado em declive, TR, C e OTR sem inclinação, e OTR/up em aclone.

3.3 Protocolo de treinamento (TR)

O protocolo de treinamento do grupo TR foi baseado no estudo de Ferreira e colaboradores¹, e composto por 8 semanas. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento seguidos de 2 dias de repouso. A tabela 1 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões de treinamento.

Tabela 1. Protocolo de treinamento.

Semana	Intensidade (%Pmax)	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação (%)	Intervalo entre as sessões (h)
1	60	15	1	0	24
2	60	30	1	0	24
3	60	45	1	0	24
4	60	60	1	0	24
5-8	60	60	1	0	24

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

O protocolo de treinamento do OTR/down também baseado no estudo de Pereira e colaboradores¹⁹, foi composto por 8 semanas sendo cada semana 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/down.

Tabela 2. Protocolo de *overtraining* em declive.

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

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

O protocolo de treinamento do grupo OTR/up também baseado no estudo de Pereira e colaboradores⁶⁷ foi realizado em 8 semanas. Cada semana experimental correspondeu à 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A tabela 4

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

Tabela 3. Protocolo de *overtraining* em active

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

3.6 Protocolo de *overtraining* sem inclinação (OTR)

O OTR será baseado no estudo de Pereira e colaboradores⁶⁷, teve duração de 8 semanas, sendo cada semana composta por cinco 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 4. Protocolo de *overtraining* sem inclinação.

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

3.7 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 TR, OTR/down, OTR/up e OTR nas semanas 4 e 8, e foi mensurada através dos testes de rotarod²⁴, teste de carga incremental^{19; 20}, teste exaustivo^{19; 20} e teste de força de preensão⁶⁸.

3.7.1 Teste do rotarod

Quarenta e oito horas após as últimas sessões dos protocolos experimentais, foi realizado o teste do rotarod. Nesse teste, o aparelho foi programado para apresentar velocidade inicial de 1rpm e final de 40rpm que foi 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 registrado²⁴. Quatro horas após a realização do teste do rotarod, os roedores realizaram o teste de carga incremental, conforme descrito no item 3.2.

3.7.2 Teste exaustivo

Vinte e quatro horas após a 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 encostarem 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min^{19; 20}.

3.7.3 Teste de força de preensão

Quatro horas após a realização do teste exaustivo, os camundongos realizaram o teste de força de preensão com a grade não inclinada. Foram realizadas três tentativas de preensão com as patas dianteiras e traseiras sem que os valores fossem considerados. Cada tentativa consistiu em tencionar 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)²⁴.

3.8 Avaliação de parâmetros metabólicos

Os camundongos dos grupos N, C, TR, OTR/down, OTR/up e OTR foram avaliados diariamente quanto à variação do peso corporal e ingestão alimentar. O valor correspondente à ingestão alimentar diária foi mensurado 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).

3.9 Extração do músculo cardíaco

Trinta e seis horas após o teste de força de preensão realizado ao final da oitava semana dos protocolos experimentais, e em jejum de aproximadamente 12h, os animais dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down, OTR/up e OTR foram anestesiados através da administração intraperitoneal de 2-2-2 tribromoetanol 2,5% (10-20 μ L.g⁻¹). O controle da anestesia foi avaliado pela perda do reflexo podal⁶⁹. Posteriormente, os corações foram retirados e os ventrículos esquerdos isolados para serem e armazenados a -80°C para análise subsequente dos conteúdos e ativação das proteínas pela técnica de *immunoblotting*, e conteúdo de glicogênio muscular.

3.10 Determinação do conteúdo proteico na membrana plasmática

Para a determinação do conteúdo de GLUT-4 e GLUT-1 na membrana plasmática, as amostras de coração foram homogeneizadas em tampão de sacarose de pH 7,4 (10 mmol / l de Tris-HCl, 1 mmol / l de EDTA e 250 mmol / l de sacarose) e submetidas à centrifugações à 100.000xg para obter amostras da membrana plasmática e de frações de microssomas enriquecidos^{70; 71}. Posteriormente, a determinação do conteúdo proteico foi realizada pela técnica de *immunoblotting*.

3.11 Immunoblotting

As amostras do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas com *Tissue-Tearor* (model 985370 variable speed; Biospec products, inc) em tampão de extração (1% de Triton X- 100, 100 mM Tris, pH 7,4, contendo 100 mM de pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg.ml⁻¹ aprotinina) a 4°C com um Polytron PTA 20S gerador (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35), operado a uma velocidade máxima de 30s. Os extratos foram centrifugados (9900g) durante 40 minutos a 4° C para remover o material insolúvel, e os sobrenadantes destes homogeneizados foram utilizados para quantificação de proteínas utilizando o método de Bradford⁷².

As proteínas foram desnaturadas por fervura em tampão de amostra de Laemmli⁷³ 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 submetidas à incubação *overnight* com anticorpo específico (anti-IL-1beta, anti-IL-6, anti-IKKalfa/beta, pIKKalfa/beta(ser180/181), p-IRS-1 (ser3017), anti-IRS-1, P-p38MAPK(tre180/tir182), anti-MAPK, p-SAPK/JNK(tre183/185), anti-SAPK/JNK, anti-TNFalfa, pAkt(ser473), anti-Akt, p-IR(tir1146), anti-IR, pAMPK(tre172), anti-AMPK, anti-PGC-1 alfa, anti-beta-actina, anti-GLUT1, e anti-GLUT4,). Dezesseis horas após a incubação com anticorpo primário foram realizadas 5 lavagens de 5 minutos 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 quimioiluminescência (GE Healthcare, ECL Plus Western Blotting Detection System, RPN2132). As imagens foram adquiridas por ChemiDoc XRS Imaging System (BioRad) e quantificados utilizando software Image Lab 3.0. Os anticorpos foram provenientes das empresas *Cell Signalling Technology* (*Cell Signalling Technology, MA, USA*), *Santa Cruz Biotechnology* (*Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA*) e *Upstate Biotechnology* (*Upstate Biotechnology, NY, USA*), de acordo com a disponibilidade. Os reagentes químicos de rotina foram provenientes da *Sigma Chemical Corporation* (*St. Louis, MO, USA*). Foram utilizados ensaios negativos para as proteínas Akt e IR.

3.12 Avaliação da tolerância intraperitoneal à insulina (ITT)

Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento físico da 8ª semana, os animais dos grupos foram submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina. Seis horas antes do início do referido procedimento experimental, os animais permaneceram sobre abstinência de alimento, mas com acesso livre a água. Através de corte na extremidade da cauda do animal, foi realizada uma primeira coleta de sangue para a dosagem de glicose o que equivale ao tempo zero do teste. Após isso, 1.5 U/kg de peso corporal de insulina (Humulin R) proveniente da *Eli Lilly* (*Indianapolis, IN, USA*) foram injetadas intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas através da extremidade da cauda dos animais nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30min para a determinação da glicose⁷⁴. A concentração de glicose foi determinada através da utilização de glicosímetro (*Advantage, Boehringer Mannheim, USA*).

3.13 Determinação do glicogênio cardíaco

Imediatamente após o sacrifício dos animais, o ventrículo esquerdo foi utilizado para determinação da concentração de glicogênio através do método fenol sulfúrico proposto por Siu et al⁷⁵. Nesse método as amostras foram digeridas em KOH a 30% aquecido e a precipitação do glicogênio foi feita através da passagem por etanol a quente. As amostras foram centrifugadas a 3000rpm durante 15min entre uma fase e outra da precipitação. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol e os valores expressos em mg/100mg de tecido úmido.

Foi realizada ainda a determinação do glicogênio através de análise histológica. O coração foi removido em diástole, limpo com soro fisiológico a 0,9% para remover o excesso de sangue e pesado imediatamente após a limpeza. O ventrículo esquerdo (LV) foi fixado em formaldeído a 10%, dissolvido em tampão fosfato salino (0,1 M pH 7,3) durante 24 h. As amostras fixas foram desidratadas numa série de etanol graduada, purificada em xileno e incorporada em Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO, EUA). Secções histológicas de 5 µm foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). O software Image-Pro Plus versão 4.5 para Windows foi usado para digitalizar as imagens de cada seção histológica. As análises foram realizadas utilizando um microscópio digital Axiophot II Zeiss Microscópio fotomicroscópio.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão. De acordo com o teste de Shapiro-Wilk verificou-se a distribuição dos grupos. O teste one-way ANOVA foi utilizado para examinar os efeitos dos protocolos nos parâmetros estudados. Quando a análise de variância indicou significância, foi utilizado o teste *post hoc* de Bonferroni. Em casos de não normalidade foi aplicado Kruska Wallis, e com a presença de significância estatística foi utilizado Games Howell *post hoc*. As análises foram bilaterais e o nível de significância adotado foi $p \leq 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS v.20.0 para Windows (IBM, Chicago, IL).

5 RESULTADOS

5.1 Desempenho físico

A figura 1 representa os dados dos testes de desempenho físico, a figura 1.A representa os resultados no teste de força de preensão (*Grip Force*), no qual todos os grupos submetidos ao protocolo de *overtraining* (OTR/down, OTR/up e OTR) apresentaram significativa queda em relação ao controle na oitava semana. Os grupos OTR/down e OTR/up apresentaram valor ainda menor quando comparados a eles mesmos na quarta semana. O grupo treinado na última semana mostrou-se significativamente maior que os grupos submetidos ao protocolo de *overtraining* e ao controle, e ainda apresentou significativa melhora quando comparado à ele mesmo nas semanas zero e quatro.

No Teste do rotarod (1.B), que avalia a coordenação motora dos roedores ⁷⁶, todos os grupos submetidos ao protocolo de *overtraining* tiveram significativa queda de *performance* quando comparada com a quarta semana. Na última semana o grupo OTR/down apresentou um desempenho significativamente menor que os grupos naive, controle e OTR, além de significativa queda no tempo de exaustão quando comparado a ele mesmo na semana antes do início dos treinamentos (semana zero).

No teste exaustivo (1.C), os grupos Treinado, OTR/down, OTR/up e OTR, que haviam sido submetidos ao protocolo de treinamento, apresentaram um desempenho significativamente melhor que o controle na quarta semana; já na oitava semana, após a aplicação do protocolo de *overtraining*, os grupos OTR/down, OTR/up e OTR, apresentaram significativa queda no tempo até a exaustão quando comparado com a quarta semana, além de desempenho significativamente menor que o treinado na oitava semana. Na última semana o grupo treinado exibiu ainda um desempenho significativamente maior que o do controle, e maior que ele mesmo antes do treinamento (semana zero).

Em relação ao teste de carga incremental (1.D), os grupos submetidos ao protocolo de OT tiveram significativa queda na velocidade de exaustão ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) quando comparada a semana oito com a semana quatro, e os grupos OTR/down e OTR/up tiveram ainda significativa queda quando comparado a semana zero. O grupo Treinado na última semana apresentou maior velocidade de exaustão quando comparado aos grupos submetidos ao protocolo de OT, e ao Controle, além de apresentar significativa melhora quando comparado a ele mesmo na semana zero.

Figura 1. Desempenho nos testes físicos nas semanas zero, quatro e oito dos grupos, Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em active) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. A) Teste de Força e Preensão; B) Teste do Rotarod; C) Teste Exaustivo; D) Teste de carga incremental. * $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo em relação à semana quatro. ** $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo em relação à semana zero. + $P < 0,05$ vs. OTR/down na mesma semana. ++ $P < 0,05$ vs. TR na mesma semana. # $P < 0,05$ vs. Controle na mesma semana.

5.2 Ingestão alimentar e massa corporal

A figura 2.A expressa a variação da ingestão alimentar ao longo do experimento. Os grupos OTR/down e OTR/up apresentaram uma diminuição significativa na ingestão alimentar da semana 0 para semana 4. Na oitava semana, o grupo treinado manteve a mesma média ingerida na quarta semana, já os grupo OTR/up e OTR, aumentaram significativamente a ingestão quando comparado com a semana zero, e o grupo OTR/down apresentou uma queda significativa da ingestão alimentar quando comparado com a semana zero.

Como indicado na figura 2.B, em relação à variação da massa corporal do mesmo grupo entre as diferentes semanas, nota-se que da semana zero para a quatro, todos os grupos tiveram aumento do peso, inclusive o grupo treinado, apesar de apresentar uma variação não significativa. Em relação à variação entre as semanas zero

e oito, todos os grupos tiveram aumento significativo de massa corporal, condizentes com o processo natural de desenvolvimento. Porém, quando comparada a quarta semana, referente ao início do protocolo de treinamento específico de *overtraining*, com a oitava semana, todos os grupos tiveram ganho significativo de peso, exceto o OTR/down.

Figura 2. A) Avaliação da ingestão alimentar ao longo do experimento dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em active) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ vs. treinado dentro da mesma semana. + $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo com a semana zero. **B) Avaliação da massa corporal ao longo do experimento dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em active) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação).** + $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo com a semana zero. * $P < 0,05$ quando comparado o mesmo grupo em relação a semana quatro.

5.3 Resposta inflamatória e via insulínica molecular

Conforme exibido na figura 3, o tecido cardíaco não apresentou diferença significativa entre os grupos nas proteínas inflamatórias; IL1-beta (3.A), IL-6 (3.B), pIKK alfa-beta(ser180/181)/IKK (3.C), P-p38MAPK (tre180/tir182)/p38MAPK (3.E), pSAPK/JNK(tre83-185)/SAPK/JNK (3.F), e TNF-alfa (3G). A única proteína associada a uma resposta inflamatória que elevou significativamente foi a pIRS1serina 307 (3.D) no grupo OTR/down, em comparação com os grupos naive e controle.

A

B

C

D

Figura 3. Avaliação das proteínas inflamatórias cardíacas dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em active) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Níveis proteicos (unidades arbitrárias), de IL1-beta (3.A), IL-6 (3.B), pIKK alpha-beta(ser180/181)/IKK (3.C), pIRS-1(ser307)/IRS-1 (3.D), P-p38MAPK (tre180/tir182)/p38MAPK (3.E), pSAPK/JNK(tre83-185)/SAPK/JNK (3.F), e TNF-alfa (3G). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ vs. Naive. ** $P < 0,05$ vs. Controle.

Em relação às respostas das proteínas envolvidas na via molecular insulínica, a figura 4 demonstra o significativo aumento da pAkt (4.A) no grupo OTR quando comparado com os grupos naive e controle. Além disso, é possível notar na figura 4.B a significativa elevação da pIRbeta nos grupos OTR/up e OTR quando comparados com naive, controle e OTR/down, não havendo outras mudanças estatisticamente significativas.

Figura 4. Avaliação da via insulínica no tecido cardíaco de Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em active) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Níveis proteicos (unidades arbitrárias), de pAkt(Ser473)/Akt (4.A), e pIRbeta(Tyr)/IRbeta (4.B). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ vs. Naive. ** $P < 0,05$ vs. Controle. + $P < 0,05$ vs. OTR/down.

A figura 5 mostra proteínas insulino independentes também potencialmente estimuladoras do transportador de glicose cardíaco, GLUT4. Conforme mostra a figura 5.A, os grupos submetidos ao protocolo de OT apresentam valores de AMPK significativamente menor que o treinado. Em relação ao PGC1 (5.B), não houve diferença significativas entre os grupos.

Figura 5. Proteínas insulino independentes potencialmente estimuladoras do transportador de glicose, GLUT4, no tecido cardíaco dos grupos, Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em alicive) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de pAMPK(Tre172)/AMPK (5.A), PGC1-alfa/beta actina (5.B). * $P < 0,05$ vs. Treinado.

A figura 6 mostra a resposta da translocação de transportadores de glicose cardíacos para a membrana celular. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos em relação ao transportador de glicose insulino independente GLUT1 (6.A), já na análise do transportador insulino dependente Glut4, o grupo OTR apresentou significativo aumento quando comparado com Naive, Controle, OTR/down e OTR/up.

Figura 6. Avaliação dos Transportadores de glicose cardíacos nos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em alicive) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de GLUT1 de membrana/GLUT1 total (6.A), GLUT4 de membrana/GLUT4 total (6.B). Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. Naive. ** $P < 0,05$ vs. Controle. + $P < 0,05$ vs. OTR/down. ++ $P < 0,05$ vs. OTR/up.

5.4 Teste de tolerância à insulina (ITT) e glicogênio cardíaco

A figura 7.A corresponde a área sobre a curva (AUC) após aplicação intraperitoneal de insulina (ITT) do tempo zero ao trinta, e a afigura 7.B expressa a resposta glicêmica após aplicação de insulina intraperitoneal, com intervalos de coleta a cada 5 minutos, não sendo evidenciada diferença significativa entre os grupo experimentais na resposta ao hormônio.

Em relação ao conteúdo de glicogênio cardíaco, conforme mostra figura 7.C, também não houve variação significativa entre os grupos.

Figura 7. Avaliação da sensibilidade à insulina e conteúdo de glicogênio cardíaco dos grupos Naive, Controle, Treinado, OTR/down (submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), OTR/up (submetidos ao protocolo de *overtraining* em active) e OTR (submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Área sobre a curva (AUC; mg.dL⁻¹ × min) da resposta glicêmica do tempo 0 ao 30 após a injeção intraperitoneal de insulina (1.0 U.kg⁻¹) (7.A), e correspondente resposta glicêmica ao longo de 30 minutos (7.B); concentração de glicogênio cardíaco em mg.100mg⁻¹ de tecido (7.C). Cada coluna representa a média ± erro padrão.

A figura 8 representa a coloração com o ácido periódico de Schiff (PAS) e mostra as diferenças no acúmulo de glicogênio cardíaco. Os grupos apresentaram a distribuição normal de grânulos de glicogênio nos miócitos. O glicogênio nos grupos TR, OTR/down, OTR/up e OTR mostram quantidades aumentadas de grânulos de glicogênio que se estendem a partir dos discos intercalados (‡) para os miócitos.

Figura 8. Caracterização histológica (x400) ventricular por ácido periódico de Schiff (8.A) e gráfico correspondente a quantificação (8.B).

6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi explorar os efeitos de três protocolos de *overtraining* nas proteínas inflamatórias e via insulínica cardíaca de camundongos corredores C57BL/6. Os principais achados da presente investigação são: I) Os três grupos submetidos ao protocolo de OT tiveram queda significativa do desempenho em todos os testes físicos, sendo esses valores mais expressivos nos grupos OTR/down e OTR/up; II) Ao final do experimento o grupo OTR/down apresentou queda significativa da ingestão alimentar sendo ainda o único grupo a não apresentar significativo aumento da massa corporal da semana 4 para a 8; III) Apenas o grupo OTR/down apresentou leve sinal de inflamação no tecido cardíaco e consequente menor conteúdo de pIR quando comparado ao OTR/up e OTR; IV) Dentre os grupos submetidos ao protocolo de *overtraining*, o grupo OTR apresentou maior translocação de Glut4 além de apresentar maior conteúdo de pAkt quando comparado aos grupos Naive e Controle; V) Os grupos submetidos ao protocolo de OT apresentaram elevação do conteúdo de glicogênio cardíaco, e baixos valores de AMPK VI) Não houve diferença significativa entre os grupos na área sobre a curva para o teste de ITT. Em resumo, os grupos OTR/up e OTR não apresentaram sinal de inflamação cardíaca e superexpressaram a via de sinalização insulínica, por outro lado, o grupo OTR/down apresentou inflamação cardíaca de baixo grau, sem queda do conteúdo de pIR(tir1146). Os três grupos apresentaram acúmulo de glicogênio no miocárdio que foi acompanhado de baixos valores de pAMPK(tre172).

6.1 Inflamação, especificidade do exercício e efeitos no desempenho físico

Os efeitos dos três protocolos de *overtraining* nos parâmetros de *performance* estão parcialmente em acordo com estudos prévios do nosso grupo de pesquisa^{25; 67; 77}. Por um lado, a queda do desempenho físico induzida por todos os protocolos de OT assim como o melhor desempenho físico do grupo Treinado ao final do experimento corroboram com as pesquisas prévias, reforçando a eficiência da reprodutibilidade dos protocolos na indução do NFOR e a importância da inserção de períodos de descanso adequado na prescrição dos treinos⁷⁸. Entretanto, o presente trabalho verificou ainda um menor desempenho no teste de Rotarod no grupo OTR/down em relação ao OTR e menor queda do grupo OTR em relação à semana zero no teste de carga incremental, pressupondo que a aplicação do mesmo protocolo em diferentes lotes de C57BL/6 talvez induzam pequenas diferenças adaptativas.

Sabe-se que o teste de Rotarod é utilizado para avaliação da coordenação motora dos roedores ⁷⁶, estando portanto, estritamente associado à integridade da função cerebral, mais especificadamente às regiões do córtex e cerebelo ⁷⁹. A predominância de diferentes tipos de contrações musculares durante o exercício físico induz diferentes respostas adaptativas, nesse sentido, estudos identificam que a corrida realizada em declive induz maiores níveis de IL-1beta no córtex e cerebelo^{80; 81}, e quando realizada de forma intensa esta associada ainda à microlesões e presença de indícios de atrofia muscular no músculo extensor longo dos dedos (EDL)⁷⁷. Tais achados poderiam justificar a maior queda de desempenho do grupo OTR/down no teste coordenativo quando comparado ao OTR.

Em relação ao teste de carga incremental, dentre os grupos submetidos ao protocolo de OT, o OTR foi o único a apresentar queda de desempenho não significativa quando comparado a ele mesmo na semana zero, além de paralelamente expressar de forma mais acentuada as proteínas associadas à via insulínica cardíaca. Sobre condições aeróbicas, a eficiência mecânica do coração é maior quando a demanda é suprida por hidratos de carbono ⁸², melhorando a eficiência contrátil do ventrículo esquerdo e minimizando a perda da eficiência oxidativa através da cadeia respiratória mitocondrial associada ao metabolismo de ácidos graxos livres, podendo assim elevar a eficiência do coração em até 30% ³². Tal fato poderia em parte justificar a menor queda do grupo OTR quando comparado aos grupos OTR/up e OTR/down, corroborando com a possível ação da expressiva resposta insulínica na eficiência da contratilidade do ventrículo esquerdo associado à melhora do volume de ejeção e consequentemente o débito cardíaco intrinsecamente associado ao VO2max minimizando assim a queda da *performance*, contudo, não o suficiente para prevenir o desenvolvimento do NFOR.

Outro fator associado à melhora do rendimento durante o exercício prolongado é o estoque de glicogênio hepático que contribui auxiliando na manutenção dos níveis de glicose sanguínea durante o exercício colaborando dessa forma com a homeostase energética⁸³. Recentemente, autores avaliando o mesmo protocolo de OT aplicado no presente estudo, verificaram que os grupos OTR/up e OTR/down apresentaram uma superexpressão da glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) e consequente aumento significativo do depósito de glicogênio hepático quando comparado ao OTR, tais dados, associados aos resultados do presente trabalho, poderiam ser justificados como uma possível adaptação compensatória às frequentes sessões de treinamento intenso visando

melhor tolerância ao exercício dos grupos OTR/down e OTR/up frente à presença da menor translocação do transportador glicídico cardíaco quando comparados ao OTR.

Apesar de o glicogênio hepático ser um importante contribuidor para a sustentação do exercício físico, e a acentuada expressão da via insulínica no miocárdio estar relacionada com maior débito cardíaco refletindo supostamente um bom desempenho aeróbico, sabe-se que estes não são os únicos fatores associados à melhora do desempenho, o que justifica a queda de *performance* evidenciada nos grupos submetidos ao protocolo de OT⁸³. Além disso, o prejuízo da via insulínica provocado pela inflamação no tecido muscular esquelético dos camundongos está também associada à queda do desempenho⁶², além dos outros mecanismos propostos em estudos anteriores^{13;16}.

6.2 Inflamação, especificidade do exercício e efeitos na ingestão alimentar e massa corporal

Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa²⁵ corrobora com a redução da ingestão alimentar evidenciada no grupo OTR/down na oitava semana quando comparada a semana zero. Segundo Pereira e colaboradores,²⁵ a especificidade das contrações excêntricas predominantes no grupo OTR/down eleva o conteúdo de citocinas pró inflamatórias no tecido hipotalâmico induzindo um quadro de inflamação transitório associado à redução da ingestão alimentar. A instalação do quadro inflamatório ocorre somente na última semana do protocolo²⁵, o que poderia ainda reforçar a evidenciada manutenção do peso da semana 4 para a 8 do grupo OTR/down.

Por outro lado, a maior ingestão alimentar observada nos grupos OTR/up e OTR, pode estar associada à alta demanda energética induzida pelo protocolo de *overtraining* aliado ao tipo de contração muscular. Sabe-se que a particularidade do exercício realizado em aclone com predominância de contrações musculares concêntricas induz à uma maior demanda energética quando comparado ao exercício com contrações predominantemente excêntricas⁸⁴, demonstrando assim o papel da especificidade da contração muscular na contribuição da tendência à maior ingestão alimentar evidenciada no grupo OTR/up quando comparada ao OTR/down^{84;85;86}. Já em relação às variações da massa corporal dos camundongos, com exceção do grupo OTR/down, o longitudinal e gradativo ganho de peso é condizente com o processo fisiológico de envelhecimento dos animais⁸⁵.

6.3 Inflamação, especificidade do exercício e efeitos na via insulínica cardíaca

Para manutenção da homeostase cardiovascular é fundamental que haja o balanço dos substratos energéticos utilizados pelos cardiomiócitos⁶¹, dessa forma, durante o exercício físico o aumento da utilização dos carboidratos como fonte energética representa uma resposta adaptativa crucial para sustentação da contratilidade miocárdica. Sabe-se que a contribuição de cada substrato energético utilizado pelos cardiomiócitos difere conforme a intensidade do exercício físico⁵¹. Estudo avaliando o metabolismo energético cardíaco durante o exercício de *endurance* em intensidade moderada⁵⁰ identificou que o coração praticamente duplicou a captação glicídica quando comparado ao seu estado em repouso, dessa forma, é possível que a elevada requisição de ATP induzida pelo protocolo de OT também leve a redução da dependência dos ácidos graxos como substrato energético dos cardiomiócitos, de maneira paralela ao aumento da oxidação de carboidratos, aprimorando assim a função mecanoenergética do coração⁸², visando suprir o aumento da eficiência cardíaca exigida^{27; 28; 30} através de adaptações moleculares como a maior expressão da fosforilação do receptor de insulina evidenciadas nos grupo OTR/up e OTR. Além disso, a elevada captação de ácidos graxos é potencialmente tóxica ao miocárdio⁸⁶, o que justificaria a maior expressão da via insulínica nos grupos OTR e OTR/up, como uma possível adaptação molecular cardioprotetora frente à alta demanda energética cardíaca requerida pelo protocolo de *overtraining*.

A divergência na resposta molecular evidenciada no grupo OTR/down que apresentou menor fosforilação do receptor insulínico quando comparado aos outros grupos submetidos aos protocolos de *overtraining* pode estar relacionada a predominância das contrações excêntricas. Estudo avaliando os efeitos de uma única sessão de corrida em declive até a exaustão em indivíduos saudáveis observou que o protocolo induziu danos no tecido muscular esquelético e um transitório quadro de resistência insulínica 48 horas após o exercício, quando comparado aos indivíduos submetidos à corrida com predominância de contrações concêntricas e aos não treinados⁸⁷. Estudo recente do nosso grupo de pesquisa¹⁷ utilizando modelos de *overtraining* a fim de avaliar os efeitos na via insulínica no tecido muscular esquelético de camundongos identificou que apenas o grupo submetido a corrida em declive apresentou menor fosforilação em tirosina do receptor insulínico muscular no grupo OTR/down quando comparado aos grupos OTR/up e OTR. Os estudos corroboram portanto, com os resultados do presente trabalho, sugerindo a hipótese de que o

exercício de *endurance* com predominância de contrações excêntricas quando realizado de maneira extenuante, é potencialmente capaz de gerar menor expressão da via insulínica não só no tecido muscular esquelético^{17; 62; 88; 89}, mas também no tecido cardíaco quando comparado ao exercício realizado com predominância de contrações concêntricas ou sem inclinação.

Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar o efeito do excesso de treinamento na via molecular inflamatória do tecido cardíaco, e os resultados mostram que os grupos OTR/up e OTR não apresentaram nenhum sinal de inflamação no tecido cardíaco conforme análises das proteínas IL1-beta, IL-6, pIKK, pIRS-1, P-p38MAPK, pSAPK/JNK e TNF-alfa, por outro lado, o grupo submetido ao protocolo de *overtraining* em declive induziu aumento significativo apenas da pIRS1 em serina 307, sugerindo a presença de um quadro inflamatório cardíaco de baixo grau. Tais dados, associados às evidências prévias que identificam no NFOR à presença de inflamação sérica crônica de baixo grau²⁰, inflamação no tecido muscular esquelético (aumento de TNFalfa)⁶², e no tecido hepático (elevação da pIKK)²⁴ em todos os protocolos de OT, nos traz a hipótese de que o tecido cardíaco possa apresentar mecanismos que competem à uma maior resistência a inflamação sistêmica induzida pelo protocolo de *overtraining*, sendo necessários mais estudos para elucidação dessa questão.

O aumento do conteúdo das proteínas inflamatórias IKK e SAPK/JNK^{90; 91}, assim como a fosforilação da IRS1 em serina 307^{92; 93}, estão diretamente relacionadas a mecanismos moleculares associados à limitações na via insulínica. Dessa forma, a ausência de inflamação cardíaca nos grupos OTR/up e OTR, assim como a elevação da pIRS1(ser307) no grupo OTR/down podem ter também contribuído para maior expressão do receptor de insulina nos grupos OTR/up e OTR quando comparado ao OTR/down. Contudo, vale ressaltar que apesar de não significativo, o grupo OTR/down apresentou valores de pIR ainda maior que o grupo Controle e valores de Akt similares ao grupo Treinado, sugerindo que o OTR/up e OTR apresentem uma superexpressão da via hormonal. Tal fato, poderia ainda justificar a diferença não significativa evidenciada no transportador glicídico Glut1 que sofre mínimas alterações após estimulação insulínica cardíaca^{94; 95}.

Estudos avaliando camundongos em NFOR^{17; 24} evidenciaram que apesar do aumento do conteúdo de proteínas inflamatórias os animais não apresentaram alterações no teste de tolerância intraperitoneal à insulina. Segundo Da Rocha e colaboradores (2015)²⁴, a elevação da captação glicídica pelo tecido hepático, evidenciada pelo

aumento da pIRbeta e do conteúdo de glicogênio no grupo OTR/down, poderia estar contribuindo para manutenção do controle glicêmico como uma resposta compensatória aos prejuízos na via de sinalização insulínica muscular. Sendo assim, o significativo aumento do conteúdo de glicogênio cardíaco e a manutenção do controle glicêmico evidenciados no presente trabalho, sugerem a hipótese de que o coração possa também estar desempenhando um papel na homeostase glicêmica dos camundongos submetidos ao protocolo de *overtraining*. Além disso, Da Rocha e colaboradores (2015)²⁴ verificaram que os grupos OTR/down e OTR/up apresentaram maior conteúdo de glicogênio hepático quando comparados ao OTR, dessa forma, é possível que a maior fosforilação das proteínas alvos da insulina, proteína quinase B (Akt) e o transportador de glicose GLUT4, no grupo OTR possa ser também uma resposta fisiológica compensatória no treinamento realizado sem inclinação.

Conforme avaliação histológica realizada no presente estudo, todos os grupos submetidos ao protocolo de OT apresentaram significativo acúmulo de glicogênio cardíaco, entretanto, a análise estatística do conteúdo glicídico realizada através do método de Siu et al⁷⁵ não evidenciou alterações significativas. Estudo avaliando o conteúdo de glicogênio cardíaco de oito ratos nadadores encontrou significância estatística no aumento de 45% do conteúdo de glicogênio também analisado por espectrofotômetro⁴². No presente trabalho os grupos OTR/down, OTR/up e OTR respectivamente apresentaram elevação do conteúdo de glicogênio em 69%, 148% e 85% quando comparados ao grupo Controle, assim, é possível que a não significância estatística mesmo na presença de alterações percentuais mais expressivas, possa estar associada ao pequeno número amostral.

A proteína PGC1-alfa também é capaz de estimular o acúmulo de glicogênio no tecido cardíaco através do estímulo do exercício físico⁴⁴, contudo, o presente estudo não evidenciou alterações significativas na expressão da proteína, o que pode ser associado ao *time course* da proteína, sendo necessários estudos a fim de identificar se a ativação teria ocorrido antes ou após a extração do tecido⁹⁶.

Se por um lado, a hipotética resistência cardíaca à inflamação que permitiria a maior expressão da via insulínica e o acúmulo de glicogênio cardíaco nos grupos submetidos ao protocolo de OT pareçam ser respostas compensatórias benéficas ao miocárdio visando melhorar a eficiência mecanoenergética⁸² e evitando lipotoxicidade⁸⁶, além de possivelmente auxiliar na manutenção da homeostase glicêmica dos camundongos, por outro lado, estudos sugerem que o descontrole no

balanço dos substratos energéticos, o acúmulo anormal de glicogênio cardíaco⁴⁷ e expressivas alterações no conteúdo de pAMPK possam ser indícios para o desencadeamento de cardiomiopatias⁹⁷.

A proteína quinase AMPK é um importante sensor energético no tecido cardíaco⁴⁵ e a alteração no conteúdo de glicogênio é considerada um potente regulador de sua atividade^{98; 99; 100}. Quando a relação ATP/AMP e/ou PCr/Cr diminuem, há aumento da pAMPK visando manter valores de adenosina trifosfato suficientes para o sustentamento da contração cardíaca, em contrapartida, quando há aumento da disponibilidade de glicose, a fosforilação da AMPK é compensatoriamente reduzida^{101; 102}. Shearer e colaboradores (2011)^{47; 103} avaliando o efeito do exercício físico no anormal acúmulo de glicogênio cardíaco de camundongos C57 diabéticos, observou que após 12 semanas de treinamento aeróbico realizado em esteira rolante os animais apresentaram acentuação do conteúdo glicídico associado à proporcional redução da fosforilação da AMPK(tre172). Dessa forma, é possível que a superexpressão da fosforilação do receptor insulínico pelos grupos OTR/up e OTR, a maior translocação do Glut4 e conteúdo de pAkt no grupo OTR, assim como o aumento dos conteúdos de glicogênio cardíaco à níveis superiores até ao grupo Treinado, apesar de não significativo, possam ser fatores relacionados à evidenciada queda da pAMPK nos grupos submetidos aos protocolos de *overtraining*.

Sabe-se que a AMPK é um protetor cardíaco endógeno¹⁰⁴, sendo as frequentes ondulações na sua ativação essenciais para o controle metabólico a fim de garantir a homeostase mecanoenergética¹⁰⁵, contudo, em situações em que há intensa queda da pAMPK, esta deixa de ser uma resposta compensatória, predispondo o tecido cardíaco à injúrias diversas¹⁰⁶. Além do seu papel no metabolismo energético, a AMPK exerce no miocárdio efeito anti-fibrótico, controle da angiogênese e hipertrofia cardíaca, além de combate ao estresse oxidativo^{97;106}. Estudos mostram que a ativação da AMPK é capaz de atenuar a fibrose cardíaca induzida por isoproterenol⁹⁷, prevenir o infarto do miocárdio¹⁰⁷, melhorar a função ventricular na insuficiência cardíaca¹⁰⁸, e é possível ainda que seu efeito mediador da NAD(P)H oxidase¹⁰⁹, reduza os riscos de disfunções endoteliais induzidas por espécies reativas de oxigênio¹¹⁰. Dessa forma, é possível que a combinação do acúmulo de glicogênio cardíaco e a queda da pAMPK(tre172) evidenciados no presente trabalho, somado ainda à elevação de espécies reativas de oxigênio geradas pelo exercício extenuante^{16; 111}, sejam preditivos de injúrias cardíacas

ocasionadas pelo excesso de treinamento independentemente da contração muscular predominante, sendo necessários mais estudos na área.

7 CONCLUSÃO

No nosso conhecimento esse é o primeiro trabalho a relatar os efeitos do *overtraining* na via insulínica cardíaca, assim como a avaliar o efeito da especificidade da predominância da contração muscular nas respostas adaptativas. Apesar da relativização das cargas de treinamento e mesmo número de sessões nos três protocolos de treinamento de *overtraining*, a especificidade das contrações musculares induziram diferentes adaptações. Os grupos OTR e OTR/up não apresentaram sinais de inflamação além de superexpressarem a via insulínica, por outro lado, o grupo OTR/down apresentou inflamação cardíaca de baixo grau, contudo, sem queda no conteúdo de pIR. Dessa forma, o presente estudo nos traz a hipótese da existência de uma suposta resistência cardíaca à inflamação que permitiria a maior expressão da via insulínica e o acúmulo de glicogênio cardíaco nos grupos submetidos ao protocolo de OT como respostas compensatórias benéficas ao miocárdio visando melhorar a eficiência mecanoenergética⁸² e evitando lipotoxicidade⁸⁶, além de possivelmente auxiliar na manutenção da homeostase glicêmica dos camundongos em NFOR, contudo, por outro lado, a queda da pAMPK(tre172) como consequência do acúmulo de glicogênio, somada ainda à elevação de espécies reativas de oxigênio geradas pelo exercício extenuante^{16; 111} são preditivos de injúrias cardíacas independentemente da contração muscular predominante, sendo necessários mais estudos na área.

8 RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Foram cumpridos todos os créditos exigidos pelo programa de pós graduação para o depósito da dissertação (tabela 5), e realizou-se o estágio PAE (Programa de Aperfeiçoamento de Ensino), na matéria de Nutrição Humana, pela Faculdade de Nutrição e Metabolismo.

TABELA 5. Disciplinas concluídas para cumprimento dos créditos exigidos no programa de pós graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional.

Ficha do aluno num. 17152 - 9262955/1 - Luciana da Costa Oliveira.									
Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
RDF5704-2/2	Tópicos Especiais em Prática Docente e Pesquisa em Fisioterapia	16/03/2015	27/04/2015	60	4	100	B	N	Concluída
RDF5716-1/2	Intervenções Fisioterapêuticas nos Sistemas Tegumentar e Neuromuscular	17/03/2015	27/04/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
RDF5721-1/1	Protocolos de Prescrição de Exercício Físico	25/03/2015	02/06/2015	60	4	100	A	N	Concluída
RDF5719-1/2	Tópicos Avançados em Treinamento de Força Muscular	05/05/2015	06/07/2015	90	6	100	A	N	Concluída
RDF5712-3/1	Ética em Pesquisa	13/08/2015	21/10/2015	60	4	100	A	N	Concluída
RCM5886-1/1	Tópicos Avançados de Investigação em Nutrologia: Gasto Energético	01/09/2015	02/11/2015	45	3	75	A	N	Concluída

Ministrou-se ainda juntamente com a equipe do laboratório, um curso de Capacitação em Biologia Molecular e Excesso de Treinamento, para alunos do primeiro ano da Escola de Educação Física e Esporte, com aulas teóricas e práticas com enfoque na linha de pesquisa do laboratório, conforme demonstrado na Tabela 6.

TABELA 6. Cronograma do mini curso de Capacitação em Biologia Molecular e Excesso de Treinamento

TEMA	DATA	HORÁRIO
Aula 1 – Overtraining Estudo dirigido artigos	31 de agosto de 2015	Segunda feira das 14h às 16h
Aula 2 – Biologia molecular Artigo	14 de setembro de 2015	Segunda feira das 14h às 16h
Aula 3 – Apresentação dos projetos mestrados	21 de setembro de 2015	Segunda feira das 14h às 16h
Aula 4 – Prática – treinamento dos camundongos	28 de setembro de 2015	Segunda feira das 14h às 16h
Aula 5 – Prática – extração dos tecidos e preparação das amostras	05 de setembro de 2015	Segunda feira das 14h às 16h

Fui aprovada no exame de qualificação realizado no dia 10 de junho de 2016, e juntamente com a equipe do laboratório foram apresentados os resultados parciais dos trabalhos intitulados “Nonfunctional overreaching in an animal model and endoplasmic reticulum stress in the heart and liver” no Second International Symposium on Inflammatory Diseases (INFLAMMA II) em 22 a 24 de junho de 2016; e no Symposium Behavioural, Autonomic and Neuroendocrine Mechanisms Regulating Homeostasis: A Lifelong Perspective, no período 25 a 27 de agosto de 2016, foi apresentado o trabalho Overtraining is associated with endoplasmic reticulum stress in the hypothalamus of mice.

Colaborei e executei também com outros projetos realizados no presente laboratório, tendo sido publicados dois artigos (10.1002/jcp.25625; 10.1139/apnm-2016-0542), e dois aceitos na revista Motriz (Hypothalamic endoplasmic reticulum stress of overtrained mice after recovery; e Nonfunctional overreaching and hepatic adaptations of APPL1 and APPL2), além de outros submetidos.

REFERÊNCIAS

- ¹ FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-765, Aug 2007. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247575500011 >.
- ² RICHARDSON, R. S. Oxygen transport: air to muscle cell. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 30, n. 1, p. 53-59, 1998. ISSN 0195-9131.
- ³ ABEL, E. D.; DOENST, T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. **Cardiovasc Res**, v. 90, n. 2, p. 234-42, May 2011. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257612> >.
- ⁴ SEVERSON, D. L. Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 82, n. 10, p. 813-23, Oct 2004. ISSN 0008-4212. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573141> >.
- ⁵ RB, K.; ET AL. Overtraining in sport: terms, definitions, and prevalence. In: PEDERSEN, B. K. (Ed.). **Exercise Immunology**. Champaign: Human Kinetics, 1998. p.7-8pp. 75–88.
- ⁶ MEEUSEN, R. et al. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome: Joint consensus statement of the European College of Sport Science (ECSS) and the American College of Sports Medicine (ACSM). **European Journal of Sport Science**, v. 13, n. 1, p. 1-24, Jan 1 2013. ISSN 1746-1391. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312443500001 >.
- ⁷ _____. Prevention, diagnosis and treatment of the Overtraining Syndrome - ECSS Position Statement 'Task Force'. **European Journal of Sport Science**, v. 6, n. 1, p. 1-14, Mar 2006. ISSN 1746-1391. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239977800001 >.
- ⁸ HALSON, S. L.; JEUKENDRUP, A. E. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. **Sports Medicine**, v. 34, n. 14, p. 967-981, 2004 2004. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225916900003 >.
- ⁹ BIRRER, D. et al. Prevalence of non-functional overreaching and the overtraining syndrome in Swiss elite athletes. **Schweiz Z Sportmedizin Sporttraumatol**, v. 61, p. 23-29, 2013.
- ¹⁰ MATOS, N. F.; WINSLEY, R. J.; WILLIAMS, C. A. Prevalence of Nonfunctional Overreaching/Overtraining in Young English Athletes. **Medicine and Science in Sports**

and Exercise, v. 43, n. 7, p. 1287-1294, Jul 2011. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000291924500020 >.

- 11 MORGAN, W. P. et al. Psychological characterization of the elite female distance runner. **Int J Sports Med**, v. 8 Suppl 2, p. 124-31, Nov 1987. ISSN 0172-4622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3692653> >.
- 12 RAGLIN, J. Overtraining and staleness-Psychometric monitoring of endurance athletes. **Handbook of research on sports psychology**, 1993.
- 13 SNYDER, A. C. Overtraining and glycogen depletion hypothesis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 7, p. 1146-1150, Jul 1998. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074599300020 >.
- 14 SNYDER, A. C. et al. OVERTRAINING FOLLOWING INTENSIFIED TRAINING WITH NORMAL MUSCLE GLYCOGEN. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 27, n. 7, p. 1063-1070, Jul 1995. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RK05500016 >.
- 15 COSTILL, D. L. et al. EFFECTS OF REPEATED DAYS OF INTENSIFIED TRAINING ON MUSCLE GLYCOGEN AND SWIMMING PERFORMANCE. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 20, n. 3, p. 249-254, Jun 1988. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988N789200006 >.
- 16 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. 317-331, Feb 2000. ISSN 0195-9131.
- 17 PEREIRA, B. C. et al. Eccentric Exercise Leads to Performance Decrease and Insulin Signaling Impairment. **Medicine and science in sports and exercise**, 2013. ISSN 0195-9131.
- 18 SOCIETY, T. A. P. **Resource book for the design of animal exercise protocols** 2006.
- 19 PEREIRA, B. C. et al. A new overtraining protocol for mice based on downhill running sessions. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 39, n. 9, p. 793-8, Sep 2012. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632058> >.
- 20 _____. Nonfunctional Overreaching Leads to Inflammation and Myostatin Upregulation in Swiss Mice. **International journal of sports medicine**, 2013.

- 21 STEENSBERG, A. et al. IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 6, p. E1272-E1278, 2002. ISSN 0193-1849.
- 22 HERSKOWITZ, A. et al. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 2, p. 419, 1995.
- 23 PAULI, J. R. et al. [New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 4, p. 399-408, Jun 2009. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649376> >.
- 24 DA ROCHA, A. L. 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. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26445495> >.
- 25 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. 231-42, Dec 2015. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26480811> >.
- 26 FLETCHER, G. F. et al. Exercise standards. A statement for health professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 82, n. 6, p. 2286-2322, 1990. ISSN 0009-7322.
- 27 SHEN, W. et al. Progressive loss of creatine maintains a near normal DeltaG approximately (ATP) in transgenic mouse hearts with cardiomyopathy caused by overexpressing Gsalpha. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 4, p. 591-9, Apr 2010. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913550> >.
- 28 CREWE, C.; KINTER, M.; SZWEDA, L. I. Rapid inhibition of pyruvate dehydrogenase: an initiating event in high dietary fat-induced loss of metabolic flexibility in the heart. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77280, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116221> >.
- 29 PURSHOTTAM, T.; KAVEESHWAR, U.; BRAHMACHARI, H. D. Changes in tissue glycogen stores of rats under acute and chronic hypoxia and their relationship to hypoxia tolerance. **Aviat Space Environ Med**, v. 48, n. 4, p. 351-5, Apr 1977. ISSN 0095-6562. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/871294> >.
- 30 FRASER, H.; LOPASCHUK, G. D.; CLANACHAN, A. S. Assessment of glycogen turnover in aerobic, ischemic, and reperfused working rat hearts. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. H1533-41, Nov 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815058> >.

- 31 ARDEHALI, H. et al. Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies. **Eur J Heart Fail**, v. 14, n. 2, p. 120-9, Feb 2012. ISSN 1879-0844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253453> >.
- 32 CHAVEZ, P. N. et al. Effect of hyperglycemia and fatty acid oxidation inhibition during aerobic conditions and demand-induced ischemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 284, n. 5, p. H1521-7, May 2003. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12521928> >.
- 33 RIMBAUD, S.; GARNIER, A.; VENTURA-CLAPIER, R. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 1, p. 131-8, 2009 Jan-Feb 2009. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307701> >.
- 34 BRYANT, N. J.; GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 4, p. 267-77, Apr 2002. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994746> >.
- 35 BROWNSEY, R. W.; BOONE, A. N.; ALLARD, M. F. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. **Cardiovasc Res**, v. 34, n. 1, p. 3-24, Apr 1997. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9217868> >.
- 36 BERTRAND, L. et al. Insulin signalling in the heart. **Cardiovasc Res**, v. 79, n. 2, p. 238-48, Jul 2008. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390897> >.
- 37 YOUNG, L. H.; COVEN, D. L.; RUSSELL, R. R. Cellular and molecular regulation of cardiac glucose transport. **J Nucl Cardiol**, v. 7, n. 3, p. 267-76, 2000 May-Jun 2000. ISSN 1071-3581. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888399> >.
- 38 WALLER, A. P. et al. GLUT12 functions as a basal and insulin-independent glucose transporter in the heart. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 1, p. 121-7, Jan 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041416> >.
- 39 SUN, D. et al. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. **Circulation**, v. 89, n. 2, p. 793-8, Feb 1994. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8313568> >.
- 40 GRAY, S.; KIM, J. K. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. **Trends Endocrinol Metab**, v. 22, n. 10, p. 394-403, Oct 2011. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680199> >.

- 41 ABEL, E. D. Glucose transport in the heart. **Front Biosci**, v. 9, p. 201-15, Jan 2004. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766360> >.
- 42 CHOU, S. W. et al. Effect of systemic hypoxia on GLUT4 protein expression in exercised rat heart. **Jpn J Physiol**, v. 54, n. 4, p. 357-63, Aug 2004. ISSN 0021-521X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15631691> >.
- 43 ZHENG, D. et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. **J Appl Physiol (1985)**, v. 91, n. 3, p. 1073-83, Sep 2001. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509501> >.
- 44 VETTOR, R. et al. Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: role in adaptation of glucose metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, n. 5, p. E519-28, Mar 2014. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24381004> >.
- 45 HOPKINS, T. A.; DYCK, J. R.; LOPASCHUK, G. D. AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. Pt 1, p. 207-12, Feb 2003. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12546686> >.
- 46 HIGASHIDA, K. et al. Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise and nutritional stimuli. **The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine**, v. 2, n. 3, p. 355-360, 2013. ISSN 2186-8131.
- 47 SHEARER, J. et al. Exercise training does not correct abnormal cardiac glycogen accumulation in the db/db mouse model of type 2 diabetes. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism**, v. 301, n. 1, p. E31-E39, 2011. ISSN 0193-1849.
- 48 ZHANG, Q. J. et al. Swim training sensitizes myocardial response to insulin: role of Akt-dependent eNOS activation. **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 2, p. 369-80, Jul 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537411> >.
- 49 ALVES, C. R. et al. Creatine-induced glucose uptake in type 2 diabetes: a role for AMPK- α ? **Amino Acids**, v. 43, n. 4, p. 1803-7, Oct 2012. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22349765> >.
- 50 GERTZ, E. W. et al. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. **J Clin Invest**, v. 82, n. 6, p. 2017-25, Dec 1988. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3198763> >.

- 51 LE DOUAIRON LAHAYE, S.; BEKONO, F. R.; BRODERICK, T. Physical activity and diabetic cardiomyopathy: myocardial adaptation depending on exercise load. **Curr Diabetes Rev**, v. 10, n. 6, p. 371-90, 2014. ISSN 1875-6417. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25543898> >.
- 52 THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 2, p. E141-5, Feb 2010. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009031> >.
- 53 LAVIOLA, L. et al. Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. **Diabetes**, v. 50, n. 12, p. 2709-20, Dec 2001. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723053> >.
- 54 HUANG, J. P. et al. Impairment of insulin-stimulated Akt/GLUT4 signaling is associated with cardiac contractile dysfunction and aggravates I/R injury in STZ-diabetic rats. **J Biomed Sci**, v. 16, p. 77, Aug 2009. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706162> >.
- 55 HALL, J. L.; SEXTON, W. L.; STANLEY, W. C. Exercise training attenuates the reduction in myocardial GLUT-4 in diabetic rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 78, n. 1, p. 76-81, Jan 1995. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7713847> >.
- 56 OSBORN, B. A. et al. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. **J Appl Physiol (1985)**, v. 82, n. 3, p. 828-34, Mar 1997. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9074970> >.
- 57 STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. **Physiol Rev**, v. 85, n. 3, p. 1093-129, Jul 2005. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987803> >.
- 58 ROSENBLATT-VELIN, N. et al. Postinfarction heart failure in rats is associated with upregulation of GLUT-1 and downregulation of genes of fatty acid metabolism. **Cardiovasc Res**, v. 52, n. 3, p. 407-16, Dec 2001. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738057> >.
- 59 BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 11, n. 1, p. 31-9, Mar 2010. ISSN 1573-2606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20180026> >.
- 60 STANLEY, W. C. et al. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. **Cardiovasc Res**, v. 33, n. 2, p. 243-57, Feb 1997. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9074687> >.

- 61 SCHEUERMANN-FREESTONE, M. et al. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. **Circulation**, v. 107, n. 24, p. 3040-6, Jun 2003. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810608> >.
- 62 PEREIRA, B. C. et al. Excessive training impairs the insulin signal transduction in mice skeletal muscles. **J Endocrinol**, v. 230, n. 1, p. 93-104, Jul 2016. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189188> >.
- 63 JAMES, D. E.; STRUBE, M.; MUECKLER, M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. **Nature**, v. 338, n. 6210, p. 83-7, Mar 1989. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2645527> >.
- 64 HALL, J. L.; SEXTON, W. L.; STANLEY, W. C. Exercise training attenuates the reduction in myocardial GLUT-4 in diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 78, n. 1, p. 76-81, 1995. ISSN 8750-7587.
- 65 HAFSTAD, A. D. et al. High- and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2287-94, Jul 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23493573> >.
- 66 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. ISSN 1472-6793.
- 67 PEREIRA, B. C. Eccentric exercise leads to glial activation, but not apoptosis, in mice spinal cord. **Internation Journal of Sports Medicine**, 2014.
- 68 JUNIOR, C. R. B. et al. Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training in mdx mice functional performance. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45699, 2012. ISSN 1932-6203.
- 69 PAULI, J. R. et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **Journal of Physiology-London**, v. 586, n. 2, p. 659-671, Jan 15 2008. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252678800028 >.
- 70 MITSUMOTO, Y.; KLIP, A. DEVELOPMENTAL REGULATION OF THE SUBCELLULAR-DISTRIBUTION AND GLYCOSYLATION OF GLUT1 AND GLUT4 GLUCOSE TRANSPORTERS DURING MYOGENESIS OF L6 MUSCLE-CELLS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 7, p. 4957-4962, Mar 5 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HF64200098 >.

- 71 OKAMOTO, M. M. et al. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. **Journal of Endocrinology**, v. 211, n. 1, p. 55-64, Oct 2011. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295000500007 >.
- 72 BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.
- 73 LAEMMLI, U. K. CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1970H022600020 >.
- 74 JEUKENDRUP, A. E. Modulation of carbohydrate and fat utilization by diet, exercise and environment. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 1270-1273, Dec 2003. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187289000037 >.
- 75 LO, S.; RUSSEL, J.; TAYLOR, A. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of applied physiology**, 1970.
- 76 SHIOTSUKI, H. et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of neuroscience methods**, v. 189, n. 2, p. 180-185, 2010. ISSN 0165-0270.
- 77 DA ROCHA, A. L. et al. Downhill Running Excessive Training Inhibits Hypertrophy in Mice Skeletal Muscles with Different Fiber Type Composition. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 5, p. 1045-56, May 2016. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26381504> >.
- 78 KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 4, p. 674-88, Apr 2004. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064596> >.
- 79 SAUSBIER, M. et al. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 25, p. 9474-8, Jun 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194823> >.
- 80 CARMICHAEL, M. D. et al. Role of brain IL-1 beta on fatigue after exercise-induced muscle damage. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 5, p. R1344-R1348, Nov 2006. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241106400019 >.

- 81 _____ . Recovery of running performance following muscle-damaging exercise: Relationship to brain IL-1 beta. **Brain Behavior and Immunity**, v. 19, n. 5, p. 445-452, Sep 2005. ISSN 0889-1591. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231275200011 >.
- 82 KORVALD, C.; ELVENES, O. P.; MYRMEL, T. Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 278, n. 4, p. H1345-51, Apr 2000. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749732> >.
- 83 CAPUTO, F. et al. Exercício aeróbio: Aspectos bioenergéticos, ajustes fisiológicos, fadiga e índices de desempenho. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 1, p. 94-102, 2009.
- 84 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. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247725300009 >.
- 85 SABINO, C. et al. Propriedades ópticas da pele de camundongos (630-905 nm): influência da idade e massa corpórea. **Proc. CBEB**, v. 479, p. 1613-1616, 2014.
- 86 OPIE, L. H.; TANSEY, M.; KENNELLY, B. M. Proposed metabolic vicious circle in patients with large myocardial infarcts and high plasma-free-fatty-acid concentrations. **Lancet**, v. 2, n. 8044, p. 890-2, Oct 1977. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/72238> >.
- 87 KIRWAN, J. P. et al. Eccentric exercise induces transient insulin resistance in healthy individuals. **J Appl Physiol (1985)**, v. 72, n. 6, p. 2197-202, Jun 1992. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629073> >.
- 88 DEL AGUILA, L. F. et al. Muscle damage impairs insulin stimulation of IRS-1, PI 3-kinase, and Akt-kinase in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 279, n. 1, p. E206-E212, Jul 2000. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088127800026 >.
- 89 AOI, W. et al. Exercise-induced muscle damage impairs insulin signaling pathway associated with IRS-1 oxidative modification. **Physiol Res**, v. 61, n. 1, p. 81-8, 2012. ISSN 1802-9973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22188104> >.
- 90 HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, Dec 14 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242805400043 >.

- 91 GAUTAM, S. et al. Nymphaea rubra ameliorates TNF- α -induced insulin resistance via suppression of c-jun NH2-terminal kinase and nuclear factor- κ B in the rat skeletal muscle cells. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 7, p. 2446-2457, 2014. ISSN 0273-2289.
- 92 HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α -and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665, 1996. ISSN 0036-8075.
- 93 VIRKAMÄKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 103, n. 7, p. 931-43, Apr 1999. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10194465>>.
- 94 RUSSELL, R. R. et al. Additive effects of hyperinsulinemia and ischemia on myocardial GLUT1 and GLUT4 translocation in vivo. **Circulation**, v. 98, n. 20, p. 2180-2186, 1998. ISSN 0009-7322.
- 95 DAVEY, K. A. et al. Immunogold labeling study of the distribution of GLUT-1 and GLUT-4 in cardiac tissue following stimulation by insulin or ischemia. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 4, p. H2009-H2019, 2007. ISSN 0363-6135.
- 96 KHOLODENKO, B. N. Cell-signalling dynamics in time and space. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 7, n. 3, p. 165-176, 2006. ISSN 1471-0072.
- 97 MA, X. et al. Cardiac fibrosis alleviated by exercise training is AMPK-dependent. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129971, 2015. ISSN 1932-6203.
- 98 WOJTASZEWSKI, J. F. et al. Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in ratskeletal muscle. **Diabetes**, v. 51, n. 2, p. 284-292, 2002. ISSN 0012-1797.
- 99 SAKODA, H. et al. Glycogen debranching enzyme association with β -subunit regulates AMP-activated protein kinase activity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 3, p. E474-E481, 2005. ISSN 0193-1849.
- 100 POLEKHINA, G. et al. AMPK β subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. **Current biology**, v. 13, n. 10, p. 867-871, 2003. ISSN 0960-9822.
- 101 HAYASHI, T. et al. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v. 47, n. 8, p. 1369-1373, 1998. ISSN 0012-1797.

- 102 SAHA, A. K. et al. Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p. 24279-24283, 2000. ISSN 0021-9258.
- 103 **Exercise training does not correct abnormal cardiac glycogen accumulation in the db/db mouse model of type 2 diabetes**
- 104 ZHANG, P. et al. AMP activated protein kinase- α 2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 918-924, 2008. ISSN 0194-911X.
- 105 YOUNG, M. E.; MCNULTY, P.; TAEGTMEYER, H. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II. **Circulation**, v. 105, n. 15, p. 1861-1870, 2002. ISSN 0009-7322.
- 106 BEAULOYE, C. et al. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. **Cardiovascular research**, v. 90, n. 2, p. 224-233, 2011. ISSN 0008-6363.
- 107 CALVERT, J. W. et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. **Diabetes**, v. 57, n. 3, p. 696-705, 2008. ISSN 0012-1797.
- 108 GUNDEWAR, S. et al. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. **Circulation research**, v. 104, n. 3, p. 403-411, 2009. ISSN 0009-7330.
- 109 CEOLOTTO, G. et al. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD (P) H oxidase via AMPK-dependent mechanism. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 12, p. 2627-2633, 2007. ISSN 1079-5642.
- 110 RÖSEN, P.; DU, X.; TSCHÖPE, D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: Prevention by α -tocopherol? In: (Ed.). **Molecular and Cellular Effects of Nutrition on Disease Processes**: Springer, 1998. p.103-111.
- 111 SMITH, L. L. Tissue trauma: The underlying cause of overtraining syndrome? **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 18, n. 1, p. 185-193, Feb 2004. ISSN 1064-8011. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000189355400028 >.