Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2017

***OVERREACHING* NÃO
FUNCIONAL EM MODELO
ANIMAL E ESTRESSE DO
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
NO FÍGADO E MÚSCULO
CARDÍACO.**

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

Nome do Aluno:
Ana Paula Pinto

Dissertação / Tese

ANA PAULA PINTO

***OVERREACHING* NÃO FUNCIONAL EM MODELO ANIMAL E ESTRESSE DO
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NO FÍGADO E MÚSCULO CARDÍACO.**

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

Orientador: Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos
da Silva

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da Unidade que aloja
o Programa, como na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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.

Pinto, Ana Paula

Overreaching não funcional em modelo animal e estresse do retículo endoplasmático no fígado e músculo cardíaco, 2017.

78 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação e Desempenho Funcional.

Orientador: Da Silva, Adelino Sanchez Ramos.

1. *Overtraining*. 2. Estresse do Retículo Endoplasmático. 3. Apoptose. 4. Fígado. 5. Coração.

Nome: PINTO, Ana Paula

Título: *Overreaching* não funcional em modelo animal e estresse do retículo endoplasmático no fígado e músculo cardíaco

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional.

Aprovado em: 03/03/2017

Banca Examinadora

Prof. Dra. Angelina Zanesco

Instituição: _____

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

Instituição: _____

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

Prof. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias

Instituição: _____

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

“Para todos que já tiveram um momento de fraqueza:
Não vai doer pra sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você”

J. A. Redmerski

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo fomento e apoio à pesquisa;

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Alisson, Gustavo, Larissa, Luciana e Rene, que me ajudaram com todos os dados, me ensinaram e motivaram, assim como fizeram do nosso laboratório um local agradável de se trabalhar, como também se tornaram amigos para vida toda;

Ao meu orientador Prof. Adelino Sanchez, pelo apoio, compreensão, carinho, idéias e motivação. Você tem minha admiração;

A todos os nossos colaboradores, pela suas participações e contribuições em nossos projetos;

A todos os funcionários da Escola de Educação Física e Esporte, assim como da USP, pelo acolhimento;

Aos parceiros do dia a dia de laboratório Bryan, Camila, Flávia, Gabriella, Milena, Priscila e Rosangela;

Ao meu amigo Gabriel e a minha amiga Gabrielle, pela constante preocupação e ajuda, assim como a todos os meus amigos;

A minha mãe, simplesmente por ser minha mãe;

A Elisa, ao meu pai e a Babalu, por conviverem comigo;

Não menos importante, a Deus.

E também a todos aqueles que de alguma forma me apoiaram e desejaram o sucesso do trabalho.

MEU MUITO OBRIGADA.

processo número: 2015/08013-0

EPIGRAFE

“In fact change takes time
It exceeds expectations
It requires both now and then
and the truth is
You gotta have the balls to change”
Joss Stone

RESUMO

PINTO, AP. *Overreaching* não funcional em modelo animal e estresse do retículo endoplasmático no fígado e músculo cardíaco. 2017. 78f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Recentemente, verificou-se que diferentes protocolos de *overtraining* (OT) com mesma carga externa, mas realizados em declive (OTR/down), aclone (OTR/up) e sem inclinação (OTR) levaram ao acúmulo de gordura hepática. Sabe-se que perturbando a homeostase do retículo endoplasmático (ER) ocorre o estresse do RE que também está associada com presença de gordura hepática em modelos animais. Com isso, verificamos os efeitos desses modelos de OT nas proteínas relacionadas ao estresse do RE (BiP, IRE1, PERK, eIF2alpha, ATF6beta, and GRP94), apoptose (CHOP, Caspase-3, 4 and 12, Bax and TRAF2) e inflamação (SAPK-JNK and IKK) no fígado de camundongos C57BL/6. Uma vez que o treinamento aeróbio pode diminuir o estresse do RE cardíaco e aumentar a capacidade do exercício, também verificou se a queda de desempenho induzida pelos protocolos de OT estaria relacionada com o estresse do RE e apoptose no coração dos animais. Os animais foram divididos em naive (N, animais sedentários), controle (CT, animais sedentários submetidos as avaliações de desempenho), treinado (TR), OTR/down, OTR/up and OTR. Os testes de rotarod, incremental, exaustivo e força de preensão foram usados para avaliar o desempenho. Trinta e seis horas após o teste de força de preensão, os fígados e corações (ventrículo esquerdo) foram removidos e usados para técnica de *immunoblotting*. Todos os protocolos de OT levaram a respostas similares em relação aos parâmetros de desempenho e mostraram valores significativamente menores de ATF6beta hepática quando comparados com o grupo N. O grupo OTR/down exibiu valores inferiores de caspase-3 clivada no fígado quando comparado com o grupo CT. As proteínas cardíacas relacionadas ao estresse do RE, apoptose e inflamação não foram moduladas nos grupos experimentais.

Palavras Chaves: *overtraining*, estresse do retículo endoplasmático, apoptose, fígado, coração.

ABSTRACT

PINTO, AP. **Nonfunctional overreaching in an animal model and endoplasmic reticulum stress in liver and heart.** 2017. 78f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Newly, we verified that different running overtraining (OT) protocols with same external load but performed in downhill (OTR/down), uphill (OTR/up) and without inclination (OTR), directed to hepatic fat accumulation. Knowing the disruption of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis is linked to animal models of fatty liver, we explored the effects of these OT models on the proteins related to ER stress (i.e., BiP, IRE1, PERK, eIF2alpha, ATF6beta, and GRP94), apoptosis (CHOP, Caspase-3, 4 and 12, Bax and TRAF2) and inflammation (SAPK-JNK and IKK) in livers of C57BL/6 mice. Because aerobic training can diminish cardiac ER stress and increase exercise capacity, we also verified whether the performance decrease induced by our OT protocols is linked to ER stress and apoptosis in mouse hearts. Rodents were divided into naïve (N, sedentary mice), control (CT, sedentary mice submitted to the performance evaluations), trained (TR), OTR/down, OTR/up and OTR groups. Rotarod, incremental load, exhaustive and grip force tests were used to estimate performance. Thirteen six hours after the grip force test, the livers and cardiac muscles (i.e., left ventricle) were removed and used for immunoblotting. All OT protocols led to similar responses of the performance parameters and showed significantly lower values of hepatic ATF6beta compared to the N group. The OTR/down group exhibited inferior values of liver cleaved caspase-3 compared to the CT group. The cardiac proteins related to ER stress and apoptosis were not modulated in the experimental groups.

Keywords: overtraining, endoplasmic reticulum stress, apoptosis, heart, liver.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de treinamento.....	31
Tabela 2 – Protocolo de <i>overtraining</i> em declive.....	31
Tabela 3 – Protocolo de <i>overtraining</i> em aclave.....	32
Tabela 4 – Protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo dos mecanismos envolvidos no estresse do retículo endoplasmático.....	25
Figura 2. Parâmetros metabólicos; (2A) peso corporal; (2B) ingestão alimentar; (2C) média ingestão/peso.....	39
Figura 3. Alterações em porcentagem (%) do teste de rotarod (3A), teste incremental (3B), teste exaustivo (3C) e teste de força de preensão (3D) da semana 0 a semana 4 e da semana 4 a semana 8.....	40
Figura 4. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de BiP (A), pIRE1 (Ser724)/IRE1 (B), pPERK (Thr981)/PERK (C), peIF2alpha (Ser52)/eIF2alpha (D), ATF6beta (E) e GRP94 (F) mensurados no fígado dos animais experimentais.....	41
Figura 5. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de CHOP (A), Caspase-3 Clivada/Caspase-3 (B), Caspase-4 (C), Caspase-12 Clivada/Caspase-12 (D), pBax (Ser184)/Bax (E) e pTRAF2 (Ser11)/TRAF2 (F) mensurados no fígado dos animais experimentais.....	42
Figura 6. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de BiP (A), pIRE1 (Ser724)/IRE1 (B), pPERK (Thr981)/PERK (C), peIF2alpha (Ser52)/eIF2alpha (D), ATF6beta (E) e GRP94 (F) mensurados no coração dos animais experimentais.....	43
Figura 7. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de CHOP (A), Caspase-3 Clivada/Caspase-3 (B), Caspase-4 (C), Caspase-12 Clivada/Caspase-12 (D), pBax (Ser184)/Bax (E) e pTRAF2 (Ser11)/TRAF2 (F) mensurados no coração dos animais experimentais.....	44
Figura 8. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de pSAPK-JNK (Thr183-185)/SAPK-JNK (A), pIKK (Ser180-181)/IKK (B) mensuradas no fígado, pSAPK-JNK (Thr183-185)/SAPK-JNK (C), pIKK (Ser180-181)/IKK (D) mensurados no coração, dos animais experimentais.....	45
Figure 9. Modelo esquemático resumando a relação entre estresse do RE, apoptose e excesso de treinamento no fígado e coração de camundongos C57BL/6.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACSM - *American College of Sports Medicine*

ASK1 - *apoptosis signal regulating kinase 1*

ATF4 - *Activating Transcription Factor 4*

ATF6 - fator 6 ativador de transcrição

BAX - *Bcl-2 associated x protein*

Bcl-2 - proteína supressora de apoptose

BIP - *binding protein*

CHOP - *C/EBP- Homologous Protein*

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CREBH - CREB – hepatócito

CT - Controle

ECSS - *European College of Sport Science*

EE - exercício excêntrico

eIF2alpha - fator de iniciação da tradução eucariótico 2alpha

ERAD - promotor de genes que codificam chaperonas e enzimas envolvidas na degradação associada ao RE

FOR - *overreaching* funcional

Foxo1 - fator de transcrição

GADD34 - *growth arrest and DNA-damage protein 34*

GCN2 - *general control non-derepressible*

Glut-4 - transportador de glicose 4

GSK3beta - glicogênio sintase quinase 3 beta

GTP - trifosfato de guanosina

Hac1 - homólogo de ATF/CREB1

HRI – *haem-regulated inhibitor*

IkB - *Inhibitor of kappa B*

IKK - IkB kinase (IKK)

IL-1beta - interleucina 1β

IL-6 - Interleucina 6

INSIG1 - *insulin-induced gene 1*

INSIG2 - *insulin-induced gene 2*

IRE1 - enzima ativada por inositol 1
IRS-1 - receptor de insulina 1
ISR - resposta ao estresse integrada
JNK - *c-jun-terminal kinase*
N - Naíve
NF-kB - fator nuclear kB
NFOR - *overreaching* não funcional
OR - *Overreaching*
OT – *overtraining*
OTR - *Overtraining* sem inclinação
OTR/down - *Overtraining* em declive
OTR/up - *Overtraining* em aclave
OTS - síndrome do *overtraining*
PERK - quinase do retículo endoplasmático semelhante à proteína quinase do pâncreas
Pmax - potência máxima
PP1C - proteína fosfatase
RE - retículo endoplasmático
RNAm - RNA mensageiro
RNAt - RNA transportador
S1P - protease serina 1
S2P - metaloprotease 2
SAPK/JNK - *stress-activated protein kinases/Jun amino terminal kinases*
SCAP - *cleavage-activating protein*
SOCS3 - *suppressor of cytokine signaling 3*
SREBP - *sterol regulatory elemento-binding protein*
TBS - solução salina tamponada com Tris
TNF-alfa - fator de necrose tumoral alfa
TR - protocolo de treinamento
TRAF2 - *tumor necrosis fator receptor-associated fator 2*
UPR - resposta a proteína não dobrada
XBP1 - *X Box Protein 1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Epidemiologia do <i>Overtraining</i>.....	18
2.2. Hipóteses do <i>Overtraining</i>	19
2.2.1. Hipótese do glicogênio.....	19
2.2.2. Hipótese da fadiga central	19
2.2.3. Hipótese das citocinas	20
2.3. Diagnóstico.....	20
2.4. Retículo Endoplasmático (RE).....	21
2.5. Enzima ativada por Inositol 1 – IRE1	22
2.6. Quinase do retículo endoplasmático semelhante à proteína quinase do pâncreas - PERK.	23
2.7. Fator 6 ativador de transcrição – ATF6.....	24
2.8. Estresse do retículo endoplasmático e patologias	25
2.9. Estresse do retículo endoplasmático e exercício físico	26
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Animais experimentais.....	30
4.2. Teste de carga incremental	30
4.3. Protocolo de treinamento (TR)	30
4.4. Protocolo de <i>overtraining</i> em declive (OTR/down).....	31
4.5. Protocolo de <i>overtraining</i> em auge (OTR/up)	31
4.6. Protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação (OTR).....	32
4.7. Avaliação do desempenho físico	32
4.7.1. Teste do rotarod.....	33
4.7.2. Teste exaustivo	33
4.7.3. Teste de força de preensão	33
4.8. Avaliação de parâmetros metabólicos	33
4.9. Extração do tecido hepático e músculo cardíaco	34
4.10. Técnica de <i>Immunoblotting</i>	34
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	35
6. RESULTADOS	36
7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	46

8. ATIVIDADES REALIZADAS.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICE 1 a 15.....	63 a 77
ANEXO 1.....	78

1. INTRODUÇÃO

Para um treinamento bem sucedido deve-se evitar a combinação de sobrecargas excessivas com recuperação inadequada (Smith, 2000; Meeusen *et al.*, 2013). De acordo com Meeusen e colaboradores (Meeusen *et al.*, 2013), o *overreaching* não funcional (NFOR) resulta de um período intensificado de treinamento, também conhecido como *overtraining* (OT), caracterizado pela queda de *performance* que pode ser revertida após semanas ou meses de recuperação, estando relacionado com alterações hormonais e psicológicas. Sobre a etiologia do NFOR, Smith (Smith, 2000) propôs a hipótese das citocinas, em que o desbalanço entre sessões intensas de treinamento com os períodos de recuperação levaria a traumatismos músculo-esqueléticos, aumentando a liberação de interleucina 1beta (IL-1beta), interleucina 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral alpha (TNF-alpha). Elevados níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias se comunicariam com outros sistemas orgânicos, desencadeando a maioria dos sinais e sintomas relacionados com o NFOR (Smith, 2000).

Como bem descrito na literatura, os mediadores inflamatórios tem impacto negativo sobre a função do retículo endoplasmático (RE), assim como o estresse do RE pode ativar a via inflamatória através da resposta a proteína mal formada (UPR) (Eizirik *et al.*, 2008). O RE é uma organela presente em células eucarióticas em que polipeptídios são sintetizados a partir do RNA mensageiro (RNAm) e se tornam proteínas maduras. O correto funcionamento do RE é essencial para a sobrevivência celular (Pirot *et al.*, 2007). O monitoramento da função reticular e a sinalização da UPR ocorrem por três proteínas associadas à membrana do RE: a enzima ativada por inositol 1 (IRE1), a quinase do retículo endoplasmático semelhante à proteína quinase do pâncreas (PERK) e o fator 6 ativador de transcrição (ATF6). Essas três proteínas estão conectadas a uma chaperona *binding protein* (BIP) nos domínios intraluminais. Quando ocorre uma situação de estresse, há recrutamento das chaperonas que se desligam das três proteínas de membrana, permitindo que as quinases IRE1 e PERK se autofosforilem e ocorra clivagem do ATF6 (Ozcan *et al.*, 2004; Stern, 2005; Eizirik *et al.*, 2008; Da Luz *et al.*, 2011).

A IRE1 ativada aciona uma região do RNAm do fator de transcrição *X Box Protein 1* (XBP1), tornando-se possível a ligação ao promotor de genes que codificam chaperonas e enzimas envolvidas na degradação associada ao RE (ERAD) (Xuan *et al.*, 2009). A IRE1 também poderá se ligar a proteína adaptadora *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2* (TRAF2) ativando a *apoptosis signal regulating kinase 1* (ASK1) e formando o complexo ternário IRE1-TRAF2-ASK1, que pode ativar a *c-jun-terminal kinase* (JNK). A JNK fosforila

determinados membros da família de proteínas supressoras de apoptose Bcl-2 que levam a apoptose dependente da *Bcl-2 associated x protein* (BAX) (Ron e Walter, 2007).

Após a fosforilação da PERK ocorre a fosforilação de sua proteína alvo, o fator de iniciação da tradução eucariótico 2alfa (eIF2alfa), no resíduo serina 51. O eIF2alfa associa-se ao RNA transportador (RNAt) e a uma molécula de trifosfato de guanosina (GTP) carregando um aminoácido de metionina com o intuito de interceder a ligação do RNAt à subunidade ribossomal 40S (Da Luz *et al.*, 2011). Entretanto, a ativação crônica da PERK aumenta a expressão de *C/EBP- Homologous Protein* (CHOP), esse aumento da CHOP associa-se com a translocação de BAX do citosol para a mitocôndria, retendo o ciclo celular e gerando a morte celular (Pirot *et al.*, 2007). Já o ATF6 transloca-se para o complexo de Golgi ocorrendo sua clivagem pela protease serina 1 (S1P) e a metaloprotease 2 (S2P) com liberação de um fator de transcrição ativo no citosol. O ATF6 induz a ativação transcricional do gene XBP1. Entretanto, se a UPR persistir, os mecanismos descritos não são suficientes para a diminuição das proteínas mal formadas, resultando em apoptose, a qual acredita-se que envolva diferentes mecanismos, como a ativação de caspases (caspases 4 e 12), cinases (JNK) e CHOP (Hummasi e Hotamisligil, 2010; Da Luz *et al.*, 2011).

Como uma estratégia não farmacológica, diversos estudos tem investigado os efeitos do exercício físico sobre o estresse do RE em diferentes condições, tanto em camundongos como em humanos (Kang, 2015; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Bozi *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2016). Kim *et al.* (2014) destacaram que os efeitos terapêuticos estão estritamente relacionados com a intensidade do exercício (Kim *et al.*, 2014). O presente grupo de pesquisa verificou as respostas de algumas proteínas relacionadas ao estresse do RE em amostras de músculo esquelético de animais submetidos ao protocolo de OT (Pereira, Da Rocha, Pinto, Pauli, De Souza, *et al.*, 2016), que acarreta ao estado de NFOR, assim como encontrou que em diferentes protocolos de OT com a mesma carga externa, mas realizados em declive (OTR/down), aclone (OTR/up) e sem inclinação (OTR), houve o aumento dos níveis séricos de IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha (Pereira, Da Rocha, *et al.*, 2015). Recentemente, Rocha *et al.* (2016) (Da Rocha, Pinto, *et al.*, 2016) observaram a maior ativação hepática de IL-6 após os protocolos de OTR/down e OTR/up e maior ativação de TNF-alpha após o protocolo de OTR/up. Além disso os três modelos de OT levaram ao acúmulo de gordura hepática (Da Rocha, Pinto, *et al.*, 2016).

Baseado no *crosstalk* entre estresse do RE e inflamação, e sabendo que o rompimento da homeostase do RE esta ligada a gordura hepática (Da Rocha, Pinto, *et al.*, 2016; Deng X, 2016), o presente projeto de pesquisa verificou os efeitos dos três protocolos de OT sobre as

proteínas relacionadas ao estresse do RE (BiP, IRE1, PERK, eIF2alpha, ATF6beta e GRP94), apoptose (CHOP, Caspase-3, 4 and 12, Bax e TRAF2) e inflamação (SAPK-JNK e IKK) no fígado de camundongos C57BL/6. Também verificou-se as mesmas proteínas no coração dos camundongos C57BL/6, um vez que atenuando o estresse do RE cardíaco há melhora da capacidade de exercício, podendo a queda de *performance* induzidas pelos protocolos de OT estar associada com o estresse do RE e apoptose no coração desses animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O treinamento pode ser definido como o processo de sobrecarga que é utilizado para perturbar a homeostase, o que resulta em fadiga aguda com consequente melhora da *performance*. Para um treinamento bem sucedido deve-se evitar a combinação de sobrecargas excessivas com recuperação inadequada (Smith, 2000; Meeusen *et al.*, 2013). De acordo com o *American College of Sports Medicine* (ACSM) e *European College of Sport Science* (ECSS), a diminuição do desempenho pode ser resultado do *overreaching* funcional (FOR), *overreaching* não funcional (NFOR) e síndrome do *overtraining* (OTS) (Birrer, 2013; Meeusen *et al.*, 2013).

No FOR, também conhecido como OR de curto prazo, o atleta é submetido a treinos intensos, muitas vezes necessários e planejados, o que leva a uma diminuição temporária do desempenho. Entretanto, quando são seguidos por períodos adequados de recuperação, que pode exigir dias, a supercompensação ocorre e o atleta apresenta aumento de desempenho em comparação com o nível da linha de base (Meeusen *et al.*, 2013). Quando a intensidade do treinamento é sustentada, o atleta pode evoluir para o NFOR, levando a estagnação ou piora do desempenho. O NFOR também está associado com distúrbios psicológicos e hormonais, tais como alterações de humor, perda de motivação, perda de apetite, perda de peso inexplicada e distúrbios do sono, podendo ser revertido após semanas ou meses de recuperação (Meeusen *et al.*, 2013).

A distinção entre NFOR e OTS é complexa, no entanto, a recuperação na OTS pode levar meses ou anos, com diminuição e/ou interrupção das cargas de treino. A palavra “síndrome” é utilizada para expressar a etiologia multifatorial da OTS, não sendo o exercício o único fator causal (Meeusen *et al.*, 2013).

2.1. Epidemiologia do *Overtraining*

Informar a exata prevalência e incidência do NFOR/OTS é extremamente difícil uma vez que há poucos estudos que indicam o prazo das coletas de dados (Birrer, 2013). O estudo de Morgan WP, O'Connor P, Sparling P, *et al.* (1987) encontrou que cerca de 60% dos corredores, tanto do sexo masculino como do sexo feminino, tiveram NFOR em algum momento da vida (Morgan, 1987). Um estudo longitudinal britânico com nadadores demonstrou que 29% desenvolveram NFOR/OTS pelo menos uma vez (Matos *et al.*, 2011).

Já em um estudo recente com atletas adolescentes 30% da amostra relatou a presença de NFOR em algum momento da carreira (Kreher e Schwartz, 2012).

Além disso, há evidências de que os atletas que desenvolveram OTS estão em risco elevado de ter uma recaída, como no estudo com nadadores universitários americanos, em que 91% dos atletas que desenvolveram OTS durante a primeira temporada foram diagnosticados novamente com OTS um ou mais dos três anos seguintes de treinamento (Raglin, 1993).

2.2. Hipóteses do *Overtraining*

Em relação ao NFOR e OTS e à sua etiologia, algumas hipóteses foram propostas para explicar um ou mais aspectos dessas disfunções de treinamento.

2.2.1. Hipótese do glicogênio

A teoria do glicogênio sugere que certos atletas são incapazes de manter uma ingestão calórica suficiente em decorrência do aumento nas cargas de treino. Esse desbalanço entre ingestão alimentar e gasto calórico, provocaria uma redução nos estoques de glicogênio nos músculos esqueléticos, sendo que a baixa quantidade de glicogênio muscular resulta em queda de *performance*, assim como, queda nas concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada, o que resultaria em fadiga decorrente da alteração na síntese de neurotransmissores centrais. Logo, a diminuição do glicogênio muscular com queda de *performance* e fadiga, levaria ao OTS (Kreher e Schwartz, 2012).

2.2.2. Hipótese da fadiga central

Com o exercício físico ocorre um aumento do triptofano livre, um aminoácido precursor da serotonina. A maior parte do triptofano no plasma circula ligado fracamente a albumina, mas o triptofano livre é carregado por meio da barreira sangue/cérebro (Kreher e Schwartz, 2012)

O triptofano competirá com aminoácidos de cadeia ramificada, como leucina, valina e isoleucina para entrada no cérebro, entretanto, devido ao aumento da oxidação decorrente do exercício nos músculos acionados há uma diminuição nos níveis dos aminoácidos de cadeia ramificada, favorecendo a entrada de triptofano que será convertido em serotonina. O

aumento da síntese de serotonina está associada com fadiga, um fator comum do NFOR (Smith, 2000; Kreher e Schwartz, 2012).

2.2.3. Hipótese das citocinas

Baseado na associação entre altos níveis de treinamento e lesão muscular, Smith (2000) introduziu a teoria das citocinas, na qual altas cargas de treinamento com recuperação insuficiente levariam a traumas na musculatura esquelética, aumentando a produção e liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . O aumento sérico dessas citocinas inflamatórias interagiriam com diferentes sistemas orgânicos, iniciando a maioria dos sinais e sintomas ligados ao NFOR e OTS (Smith, 2000).

A presente hipótese também traz que o triptofano é usado para síntese de proteínas inflamatórias, tendo seus níveis diminuídos com a inflamação sistêmica, associando-se com os sintomas de depressão. Assim como a presença de IL-1 β e TNF- α agindo no cérebro podem causar distúrbios no sono, depressão e queda do apetite, como observado em atletas em OTS (Smith, 2000).

2.3. Diagnóstico

Como bem estabelecido na literatura, o OTS é caracterizado pela queda da *performance* acompanhada de distúrbios de humor, sendo essa queda de *performance* persistida após semanas de recuperação. Fry *et al.* (1991) classificaram mais de 90 sintomas de NFOR e OTS de acordo com sua prevalência na literatura como parâmetros bioquímicos, imunológicos, fisiológicos e psicológicos (Fry *et al.*, 1991). Como não existe uma ferramenta para identificação do OTS o diagnóstico só deve acontecer após exclusão de doenças orgânicas, como desordens hormonais, doenças infecciosas e deficiência de ferro, restrições dietéticas, problemas psicológicos e emocionais (Smith, 2000; Meeusen *et al.*, 2013). Entretanto, a diminuição ou estagnação do desempenho é o único marcador cientificamente reconhecido para o diagnóstico destas disfunções (Meeusen *et al.*, 2013).

Estudos nas áreas de FOR, NFOR e OTS são dificultados pela falta de atletas dispostos a arriscarem uma temporada de treinamento e suas competições. Dessa forma, a utilização de modelos animais é uma alternativa aceitável para o estudo dessas disfunções. Nesse sentido, Pereira *et al.* (2012) desenvolveram um protocolo de OT fundamentado em sessões crônicas de corrida em declive que induziu o NFOR em camundongos (Pereira *et al.*,

2012). Os autores também averiguaram que o protocolo de OT baseado em exercício excêntrico (EE) prejudicou a transdução do sinal da via de insulina com concomitante aumento dos níveis proteicos de SAPK-JNK, IKK e SOCS3 (Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Rocha, *et al.*, 2014).

Como uma estratégia não farmacológica, diversos estudos tem investigado os efeitos do exercício físico sobre diversas doenças, assim como o estresse do RE em diferentes condições (Kang, 2015; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Bozi *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2016). Kim *et al.* (2014) destacaram que os efeitos terapêuticos estão estritamente relacionados com a intensidade do exercício (Kim *et al.*, 2014). Um recente estudo comparou o estresse do retículo endoplasmático e sinalização de apoptose em ratos treinados em exercícios de baixa e alta intensidade. Após adaptação, os ratos corriam em esteiras com inclinação de 10°, durante 60min, 5x/semana. As velocidades das esteiras foram fixadas em 20 m/min no grupo de baixa intensidade e 34 m/min no grupo de alta intensidade. Para entender os efeitos do estresse do RE e da UPR no músculo esquelético avaliou-se a fosforilação da PERK e os níveis de BIP após 5 semanas de treinamento. Embora as duas intensidades de exercício apresentaram aumento da fosforilação da PERK no músculo esquelético, não houve diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Entretanto, o grupo de alta intensidade apresentou níveis significativamente reduzidos de BIP (Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014).

2.4. O Reticulo Endoplasmático (RE)

O RE é uma organela dinâmica presente em células eucarióticas, com papel central na biossíntese proteica e lipídica, em que polipeptídios são sintetizados a partir do RNAm (Eizirik *et al.*, 2008). As proteínas adentram o RE como cadeias polipeptídicas não dobradas e se tornam proteínas maduras após o processo de enovelamento composto pelo desdobramento, montagem, formação de pontes dissulfetos e glicosilação de proteínas (Ron e Walter, 2007; Da Luz *et al.*, 2011). Por se tratar de uma situação dinâmica, as células combinam a capacidade de dobragem das proteínas do RE de acordo com as suas necessidades, assegurando assim a qualidade das proteínas secretadas. Este controle homeostático é obtido pela ativação do sinal de transdução, que possui sensores no revestimento do lúmen do RE e efetores que comunicam a mensagem para outros compartimentos da célula (Ron e Walter, 2007; Da Luz *et al.*, 2011). O RE também tem

papel importante na sinalização e estoque de cálcio (Ca^{2+}), assim como em processos celulares como organogênese e apoptose (Eizirik *et al.*, 2008).

O adequado funcionamento do RE é de suma importância para a sobrevivência celular. O RE é extremamente sensível há alterações homeostáticas e as proteínas formadas podem não atingir sua conformação correta devido a ausência de chaperonas ou energia celular para gerar interações proteína-chaperona, depleção de Ca^{2+} , interrupção do estado redox, mutações proteicas que prejudicam a montagem de proteínas e redução das pontes dissulfetos (Eizirik *et al.*, 2008). Quando o RE é submetido a distúrbios na síntese proteica, aumentando a síntese de proteínas imaturas, conhecidas como proteínas *unfolded* (não dobradas) e *misfolded* (mal dobradas), uma resposta adaptativa conhecida como UPR é acionada (Da Luz *et al.*, 2011; Deldicque *et al.*, 2013). O desequilíbrio entre a carga de proteínas não dobradas que adentram o RE e a capacidade celular de lidar com esta carga é definida por três respostas principais: primeiramente, ocorre redução na carga de proteína que entra no RE, se tratando de uma adaptação transitória obtida através da redução da síntese de proteínas e translocação para o RE; em segundo lugar, há um aumento na capacidade do RE em manejar proteínas mal dobradas. Trata-se de uma adaptação a longo prazo a qual envolve a ativação da transcrição de genes alvo da UPR. O terceiro mecanismo será ativado caso a homeostase não seja reestabelecida, sendo ele a morte celular (Ron e Walter, 2007; Da Luz *et al.*, 2011)

Desequilíbrios na sinalização da UPR podem gerar o “estresse do retículo”, que é definido como um desequilíbrio entre a carga de proteína e capacidade de dobragem. O monitoramento da função reticular e a sinalização da UPR ocorrem por três proteínas associadas à membrana do RE: a IRE1, a PERK e o ATF6. Essas três proteínas são mantidas inativas, pois estão conectadas a uma chaperona BIP nos domínios intraluminais. No entanto, quando ocorre uma situação de estresse, como excesso de proteínas imaturas no RE, há recrutamento das chaperonas que acabam se desligando das três proteínas de membrana, permitindo que as quinases IRE1 e PERK se autofosforilem e ocorra clivagem do ATF6 (Stern, 2005; Ron e Walter, 2007; Eizirik *et al.*, 2008; Da Luz *et al.*, 2011).

2.5. Enzima ativada por Inositol 1 – IRE1

A IRE1 oligomeriza-se na membrana, em resposta a UPR, permitindo a *trans*-autofosforilação, assim seu domínio endoribonuclease é ativado. Uma vez que a *trans*-autofosforilação acontece, ocorre a clivagem endonucleolítica do único substrato conhecido:

um RNAm que codifica um fator de transcrição denominado XBP1, em células eucarióticas (Ron e Walter, 2007). Ocorre um desvio de enquadramento na sequência de codificação quando as duas extremidades do RNAm são ligadas. O XBP1 RNAm unido (*spliced*) codifica um potente ativador transcricional, o XBP1s, enquanto que o RNAm não unido (*unspliced*) codifica o XBP1u, um inibidor da resposta a UPR (Ron e Walter, 2007)..

O XBP1 tem função na redução da tradução global e fluxo de proteínas novas para o RE, tornando-se possível a ligação ao promotor de genes que codificam chaperonas e enzimas envolvidas na degradação associada ao RE (ERAD) (Xuan *et al.*, 2009). Em adição, persistindo o estresse, a IRE1 pode se ligar a proteína adaptadora TRAF2, ativando a ASK1 e formando o complexo ternário IRE1-TRAF2-ASK1. O complexo pode levar a ativação da *factor nuclear kappa B* (NF- κ B), o que pode ter efeitos pró ou anti apoptóticos dependendo do tipo celular e do contexto. Também tem sido relacionado com a ativação da caspase 12 e morte celular, assim como permite a ativação da JNK. A JNK fosforila determinados membros da família de proteínas supressoras de apoptose Bcl-2 que levam a apoptose dependente de *Bcl-2 associated x protein* (BAX) (Ron e Walter, 2007; Eizirik *et al.*, 2008).

2.6. Quinase do retículo endoplasmático semelhante à proteína quinase do pâncreas - PERK

No RE, a porção citoplasmática da PERK, que contém um domínio da proteína quinase, sofre *trans*-autofosforilação por oligomerização. Entretanto, sua ativação procede na fosforilação de sua proteína alvo, o eIF2 α no resíduo serina 51 (Hummasti e Hotamisligil, 2010; Da Luz *et al.*, 2011). Esta fosforilação inibe o fator de troca do nucleotídeo guanina eIF2 β , um complexo pentamérico que recicla a eIF2 na sua forma ativa ligada ao GTP, já que outras quinases eIF2 (HRI – *haem-regulated inhibitor*) e GCN2 (*general control non-derepressible*) podem ativar esta via independentemente do estresse do RE. Esta parte da resposta da UPR é denominada resposta ao estresse integrada (ISR) (Ron e Walter, 2007; Sadighi Akha *et al.*, 2011). O eIF2 α associa-se ao RNA transportador (RNAt) e ao GTP carregando um aminoácido de metionina com o intuito de interceder a ligação do RNAt à subunidade ribossomal 40S (Da Luz *et al.*, 2011). O eIF2, quando em condições que o limitam, aumenta a tradução do ATF4, uma via promotora de vários genes relacionados a UPR, enquanto o NF κ B é ativado após a tradução (Pirot *et al.*, 2007; Ron e Walter, 2007). A recuperação da fosforilação do eIF2 α é mediada pelo *Growth Arrest and DNA-damage protein 34* (GADD34), que interage com a subunidade catalítica da proteína fosfatase (PP1C)

e leva a desfosforilação do eIF2alfa (Pirot *et al.*, 2007; Ron e Walter, 2007; Eizirik *et al.*, 2008).

Entretanto, a ativação crônica da PERK aumenta a expressão de CHOP, também conhecida como GADD153, através de uma via do ATF4. Esse aumento de CHOP induzindo a apoptose relaciona-se com a translocação de BAX do citosol para a mitocôndria, na menor ativação da expressão de BCL-2 e depleção de glutatona perturbando o estado redox, na maior ativação dos receptores de morte e na indução do TRB3, um inibidor da AKT que parece contribuir para o estresse do RE através da apoptose (Eizirik *et al.*, 2008). A maioria dos sinais apoptóticos levam a ativação das caspases, entretanto ainda não se sabe se existe uma via específica responsável pela apoptose mediada pelo estresse do RE. O envolvimento das caspases iniciadoras 2, 8 e 9 e das caspases efetoras 3, 4 e 7 tem sido relatados e, a caspase 12 tem sido proposta como um mediador específico do estresse do RE induzido por apoptose em células de roedores (Oakes *et al.*, 2005).

2.7. Fator 6 ativador de transcrição – ATF6

Em condições de estresse do RE, a ATF6 é transportada para o complexo de Golgi, sendo clivada por proteases residentes. Inicialmente pela S1P, e em seguida, em uma região intramembranar pela S2P, liberando a porção citosólica de ligação do DNA, a ATF6f (f de fragmento). A ATF6f move-se então para o núcleo e induz a ativação transcricional do gene XBP1 que quando traduzido liga-se ao ERAD (Seo *et al.*, 2008).

Os mecanismos citados têm o escopo de proteger a morte celular, diminuindo a síntese em geral e aumentando a produção de chaperonas. Entretanto, se a UPR persistir, os mecanismos descritos não são suficientes para a diminuição das proteínas mal formadas, resultando em apoptose, a qual acredita-se que envolva diferentes mecanismos, como a ativação de caspases (caspases 4 e 12), cinases (JNK) e CHOP (Ron e Walter, 2007; Da Luz *et al.*, 2011). A Figura 1 demonstra um resumo das vias citadas acima.

Figura 1. Resumo dos mecanismos envolvidos no estresse do retículo endoplasmático

Fonte: Próprio autor

2.8. Estresse do retículo endoplasmático e patologias

Com a ativação persistente da UPR, o NF- κ B poder ser ativado através da supressão da transcrição do *Inhibitor of kappa B* (I κ B), envolvidos por mecanismos da PERK, derivando na regulação de mediadores da inflamação como IL-6 e TNF- α . Assim, acredita-se que o estresse do RE possa ativar a via inflamatória através da UPR, como também os mediadores inflamatórios (JNK e IKK) podem ter impacto negativo sobre a função do RE (Ron e Walter, 2007; Seo *et al.*, 2008). O estresse do RE também tem sido definido como uma via envolvida na patogênese de diversas doenças, como obesidade, *diabetes mellitus*, câncer e esteatose hepática não alcoólica (Ozcan *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012). A UPR está ligada a regulação de lipogênese e reservas lipídicas hepáticas, assim como a inflamação, estresse oxidativo e danos na sinalização de insulina. A ativação de componentes da UPR na obesidade e na esteatose hepática não alcoólica sugerem que uma alteração na função normal do RE contribui para esteatose ou progressão da doença (Ozcan *et al.*, 2004). O estresse do RE também ativa a JNK, o que leva a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) no aminoácido incorreto, causando uma diminuição na expressão do transportador de glicose 4 (GLUT-4) (Ordoñez, 2015). Recentemente, descobriu-se que a CREB – hepatócito (CREBH) pode ser ativada pela proteólise regulada pelo estresse do RE. Entretanto, a CREBH não está envolvida na ativação de genes que melhoram a capacidade da via secretora, mas sim na ligação entre o estresse do RE no fígado com a secreção de proteínas

do soro que estão associadas com a inflamação (chamada proteínas de resposta de fase aguda) (Eizirik *et al.*, 2008).

Demonstrou-se também que o estresse do RE contribui para lesão isquêmica do miocárdio. A disfunção do RE induzida pela isquemia pode iniciar a morte celular mitocondrial dependente e independente, como resultado do rompimento na homeostase do cálcio e/ou o dobramento de proteínas (Murlasits *et al.*, 2007). Assim como, pode iniciar a apoptose através do seu efeito sobre a mitocôndria, que envolve as proteínas da família dos pro-apoptóticos Bcl-2, que conduzem a perda do potencial da membrana mitocondrial, como ainda sensibilizar as mitocôndrias para sinais pro-apoptóticos através da regulação positiva do fator de transcrição CHOP (Murlasits *et al.*, 2007).

Seja pelo sistema fisiológico ou por envolvimento na patogênese de diversas doenças, a UPR ativada possui diversos genes chaves que estão envolvidos com a ERAD. A ERAD intercede a retro translocação de proteínas não dobradas do lúmen do RE para o citosol para degradação pelo proteossoma. Porém, diversas proteínas mal formadas tem dificuldade para degradar-se por esse mecanismo, com isso um mecanismo alternativo para degradação dessas proteínas é a autofagia. Esses mecanismos objetivam reduzir o nível de estresse do RE. No entanto, quando o estresse é extremamente alto, ocorre a morte celular (B'chir *et al.*, 2013)

O estresse do RE pode implicar na ativação de vários efetores envolvidos na morte celular como as BAK e BAX, sinalizadas através da mitocôndria, ou caspase 12, ativada no citoplasma. A ativação da JNK, mediada pela IRE1, corrobora a morte celular pela fosforilação e inativação do regulador antiapoptótico Bcl-2. A fosforilação da eIF2 α , através da ativação da PERK, também relaciona-se com a morte celular, pois inibe a síntese de proteínas *pro-survival* (Ron e Walter, 2007).

A ativação desses efetores envolvidos na morte celular foi evidenciada por Ozcan *et al.* (2004) que demonstraram que em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, a fosforilação da PERK e IRE1 nos tecidos hepático e adiposo, além da expressão da JNK, estavam aumentadas significativamente em comparação com ratos não obesos. A PERK e a eIF2 α são determinantes na fisiopatologia da resistência à insulina e *diabetes mellitus* tipo 2, por mecanismos dependentes de JNK, em roedores obesos (Ozcan *et al.*, 2004).

2.9. Estresse do retículo endoplasmático e exercício físico.

Como já relatado e demonstrado em diversos trabalhos a obesidade, o *diabetes mellitus*, o câncer e a esteatose hepática não alcoólica induzem ao estresse do RE (Boden,

2009; Da Luz *et al.*, 2011; Dara *et al.*, 2011; Deldicque, 2013; Bozi *et al.*, 2016). Verificou-se que com a prática do exercício físico, ratos obesos apresentam melhora da sinalização da insulina sendo associada com diminuição da inflamação e de proteínas sinalizadoras do estresse do RE (Boden, 2009). Assim como, o exercício físico demonstrou efeitos positivos no tratamento da esteatose hepática, com atenuação do estresse oxidativo hepático. Também foi visualizado um efeito cardioprotetor na lesão isquêmica, apesar de não se ter observado alteração na expressão de proteínas no estresse do RE (Murlasits *et al.*, 2007; Ordoñez, 2015).

Recentemente, vários estudos (Kim *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011) têm investigado o estresse do RE no tecido muscular durante o exercício. A ativação da UPR foi observada no músculo esquelético de humanos após 200 km de corrida (Kim *et al.*, 2011) e, após quatro semanas de treinamento físico houve aumento da UPR como uma adaptação ao estresse do RE (Wu *et al.*, 2011). Assim, a contração do músculo está diretamente envolvida na ativação da UPR, implicando que o treinamento físico pode induzir uma adaptação do estresse do RE no músculo esquelético. Além disso, os efeitos terapêuticos do exercício e a indução das respostas biológicas são conhecidas por estarem estreitamente relacionadas com a intensidade do exercício (Kim *et al.*, 2011).

Rayavarapu *et al.* (2012) acreditam que o estresse do RE induzido pelo exercício físico no músculo esquelético é um mecanismo adaptativo, que se torna patológico na presença de excesso do estresse do RE, uma vez que há um *cross-talk* com as mitocôndrias, ativando assim as vias inflamatórias e de morte celular (necrose, autofagia e apoptose) (Rayavarapu *et al.*, 2012).

Entretanto, o OT, pode levar a queda do desempenho conforme demonstrado por Pereira *et al.* (2012) (Pereira *et al.*, 2012), presença de inflamação crônica de baixa intensidade tanto no soro (IL-6) quanto em diferentes amostras de músculo esquelético (IL-6 e TNF-alfa), além da presença elevada de concentrações proteicas de miostatina no músculo esquelético (Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Rocha, *et al.*, 2014). Além disso, Pereira *et al.* (2016) induziram camundongos C57BL/6 a três diferentes protocolos de OT em corrida realizados em declive (OTR/down), acline (OTR/up) e sem inclinação (OTR) e verificaram que o grupo OTR/down apresentou aumento das proteínas pIRE-1, pPERK e pEIF2alpha nos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo, que não foi normalizadas após o período de recuperação total. Os outros dois grupos de OT demonstraram aumento das proteínas BiP, pPERK e pEIF2alpha, somente no músculo sóleo e essas proteínas não foram normalizadas após o período de

recuperação total para o grupo OTR/up (Pereira, Da Rocha, Pinto, Pauli, De Souza, *et al.*, 2016).

Recentemente, Rocha *et al.* (2016) verificaram o aumento de IL-6 hepática após os protocolos de OTR/down e OTR/up e aumento de TNF-alpha após o protocolo de OTR/up. Além disso, os três modelos de OT levaram ao acúmulo de gordura hepática. Sabe-se que o desequilíbrio da homeostase do RE está associado com aumento da gordura hepática em modelos animais (Da Rocha, Pinto, *et al.*, 2016), e que o treinamento aeróbio pode atenuar o estresse do RE cardíaco e melhorar a capacidade do exercício (Bozi *et al.*, 2016), porém ainda não se sabe as consequências do desequilíbrio entre o excesso de exercício e o período destinado a recuperação sobre o tecido hepático e o músculo cardíaco.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar os três protocolos de OT realizados em declive, aclone e sem inclinação sobre o estresse do retículo endoplasmático, apoptose e inflamação no tecido hepático e músculo cardíaco dos camundongos em *overreaching* não funcional (NFOR).

Com o intuito de verificar a relação dos parâmetros destacados acima com o desempenho físico dos camundongos, além dos três grupos em OT, também foram avaliados roedores submetidos ao protocolo de treinamento (TR) proposto por Ferreira *et al.* (Ferreira *et al.*, 2007), que está associado com o aumento do desempenho físico no teste de carga incremental e exaustivo (Ferreira *et al.*, 2007; Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Rocha, *et al.*, 2014; Pereira, Lucas, *et al.*, 2015).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o peso corporal, ingestão alimentar e desempenho físico (teste de rotarod, incremental, exaustivo e força de preensão) de camundongos;
- Verificar o conteúdo das proteínas relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático (BiP, IRE1, PERK, eIF2alpha, ATF6beta e GRP94), apoptose (CHOP, Caspase-3, 4 e 12, Bax e TRAF2) e inflamação (SAPK-JNK e IKK) no tecido hepático e músculo cardíaco pela técnica de *immunoblotting*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados 90 camundongos C57BL/6 com 8 semanas de vida provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) em um ciclo invertido de 12h claro-escuro, com livre acesso a ração (Purina) e água. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (ID 14.1.873.53.0). Os camundongos foram divididos em 6 grupos: Naíve (N; n=15; sedentários), Controle (CT; n=15; sedentários que realizaram os testes físicos), Treinado (TR; n=15; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; n=15; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em aclone (OTR/up; n=15; submetidos ao protocolo de *overtraining* em aclone) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; n=15; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação).

4.2. Teste de carga incremental

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

4.3. Protocolo de treinamento (TR)

O protocolo de treinamento foi baseado no estudo de Ferreira *et al* (Ferreira *et al.*, 2007) e foi composto por 8 semanas. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A tabela 1 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões 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

4.4. Protocolo de *overtraining* em declive (OTR/down)

O protocolo de OTR/down foi realizado conforme padronizado por Pereira *et al.* (Pereira *et al.*, 2012; Pereira, Lucas, *et al.*, 2015) e composto por 8 semanas divididas em 5 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A tabela 2 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo do OTR/down.

Tabela 2. Protocolo de *overtraining* em declive

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

4.5. Protocolo de *overtraining* em active (OTR/up)

O protocolo de OTR/up foi baseado no estudo de Pereira *et al.* (Pereira, Lucas, *et al.*, 2015) e composto por 8 semanas divididas em 5 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A tabela 3 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo do OTR/up.

Tabela 3. Protocolo de *overtraining* em active.

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

4.6. Protocolo de *overtraining* sem inclinação (OTR)

O protocolo de OTR foi baseado no estudo de Pereira *et al.* (Pereira, Lucas, *et al.*, 2015) e composto por 8 semanas divididas em 5 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A tabela 4 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	Fase do treinamento	Intensidade (%Pmax)	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação	Intervalo entre as sessões (h)
1	F1	60	15	1	0	24
2	F1	60	30	1	0	24
3	F1	60	45	1	0	24
4	F1	60	60	1	0	24
5	F2	60	60	1	0	24
6	F3	70	60	1	0	24
7	F4	75	75	1	0	24
8	F5	75	75	2	0	4

4.7. 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 OTR/down, OTR/up, OTR e TR nas semanas 4 e 8, e foi composta pelo teste do rotarod (Turgeman *et al.*, 2008; Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Da Rocha *et al.*, 2015), teste de carga incremental (J. Mark Davis, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Da Rocha *et al.*, 2015), teste exaustivo (Pereira *et al.*, 2012; Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Da Rocha *et al.*, 2015), e teste de força de preensão (Pereira *et al.*, 2012; Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Da Rocha *et al.*, 2015).

4.7.1. Teste do rotarod

Após 48 horas das últimas sessões dos protocolos experimentais, o teste do rotarod foi realizado. Nesse teste, o aparelho foi programado para iniciar com velocidade de 1rpm e final de 40rpm, alcançada 300s após o início do movimento. A aceleração durante todo teste foi constante, sendo realizadas três tentativas por animal, com intervalo de 10s, e o tempo (s) até a queda de cada animal foi registrado (Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Da Rocha *et al.*, 2015). Após 4h da realização do teste do rotarod, os roedores realizaram o teste de carga incremental, conforme descrito no item 4.2 dessa dissertação de mestrado

4.7.2. Teste exaustivo

Após 24 horas da realização do teste de carga incremental, os camundongos correram na velocidade de 36m/min com inclinação de 8% até exaustão voluntária, que ocorreu quando os mesmos encostaram 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min (Pereira, Pauli, De Souza, Ropelle, Cintra, Freitas, *et al.*, 2014; Da Rocha *et al.*, 2015).

4.7.3. Teste de força de preensão

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

4.8. 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. A ingestão alimentar diária foi mensurada através da subtração do peso da ração final (peso da ração restante em

cada gaiola individual ao final de 24h) pelo peso da ração inicial (peso da ração colocada em cada gaiola individual 24h antes do peso da ração final).

4.9. Extração do tecido hepático e músculo cardíaco

Depois de 12 horas de jejum noturno, os animais foram anestesiados com injeções intraperitoneais de 2-2-2 tribromoetanol 2,5% (10-20 μ L.g⁻¹). Assim que o efeito da anestesia foi confirmado pela perda dos reflexos podais, a cavidade abdominal foi aberta, o fígado e o coração (ventrículo esquerdo) dos animais foram removidos, triturados e homogeneizados em tampão de extração (1% de Triton X-100, 100mM Tris, pH 7,4, contendo 100mM de pirofosfato de sódio, o fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, 10mM de vanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL aprotinina) a 4°C com o auxílio de um *Polytron* PTA 20S gerador (*Brinkmann Instruments* modelo PT 10/35), operado em velocidade máxima durante 30s. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm durante 40min. No sobrenadante, foi determinada a concentração de proteínas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976).

4.10. Técnica de *Immunoblotting*

As proteínas foram desnaturadas por fervura em tampão de amostra de *Laemmli* contendo DTT 100mM, executadas em gel SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE *Healthcare*, *Hybond* ECL, RPN303D). A eficiência da transferência para as membranas de nitrocelulose foi verificada por coloração breve das bandas com Ponceau. Estas membranas foram então bloqueadas com solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo 5% de BSA e 0,1% de *Tween-20*, durante 1 hora, a 4° C. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos específicos (anti-ATF6beta, anti-BIP, anti-CHOP, anti-eIF2alfa, *phospho*-eIF2alfa, anti-IRE1alfa, *phospho*-IRE1alfa, anti-PERK, *phospho*-PERK, anti-caspase 12, anti-caspase 4, anti-BAX, *phospho*-BAX, anti-TRAF2, *phospho*-TRAF2, anti-SAPK-JNK, *phospho*-SAPK-JNK, anti-IKK, *phospho*-IKK e anti-beta actina).

Após 16 horas da incubação com anticorpo primário, foram realizadas 5 lavagens de 5 min com TBS contendo 0,1% de *Tween-20*. Posteriormente, todas as membranas foram incubadas durante 1 hora a 4° C com anticorpo secundário. As bandas imunorreativas específicas foram detectadas por quimioluminescência (GE *Healthcare*, *ECL Plus Western*

Blotting Detection System, RPN2132). As imagens foram adquiridas pelo *C-DiGitTM Blot Scanner* (LI-COR^R, Lincoln, Nebraska, USA) e quantificadas utilizando o *software Image Studio for C-DiGit Blot Scanner*. Os anticorpos foram provenientes das empresas *Cell Signalling Technology* (*Cell Signalling Technology*, MA, USA), *Santa Cruz Biotechnology* (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*, CA, USA) de acordo com a disponibilidade. Os reagentes químicos de rotina foram provenientes da *Sigma Chemical Corporation* (*St. Louis, MO, USA*).

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Enquanto o teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para testar a normalidade dos dados, o teste de *Levene* foi utilizado para testar a homogeneidade das variâncias. O teste one-way ANOVA foi utilizado para examinar os feitos dos protocolos de TR e OT. Quando houve significância estatística, *Bonferroni post hoc* foi utilizada. Quando não houve a presença de distribuição normal o teste de *Kruska Wallis* foi utilizado para examinar os efeitos dos protocolos de TR e OT. Quando *Kruska Wallis* indicou significância estatística, *Games Howell post hoc* foi utilizado. Todas as análises foram bilaterais e o nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *SPSS v.20.0* para windows (IBM, Chicago, IL).

6. RESULTADOS

Em relação aos parâmetros metabólicos, pode-se observar na figura 2A o peso corporal (gramas) de cada grupo experimental entre suas respectivas semanas 0, 4 e 8. Na semana 0 tanto o grupo N como o grupo OTR apresentaram diferença significativa em relação ao grupo TR na mesma semana. Observa-se que da semana 0 para semana 4 houve ganho significativo de peso corporal em todos os grupos, exceto o grupo TR, e da semana 0 para semana 8 houve aumento do peso corporal em todos os grupos. Já na figura 2B, é possível verificar a ingestão alimentar dos grupos experimentais entre suas respectivas semanas 0, 4 e 8. Na semana 0, os grupos OTR/down e OTR/up apresentaram uma ingestão alimentar significativamente maior quando comparado com o grupo CT para a mesma semana. Na semana 8, os grupos OTR/up e OTR apresentaram uma ingestão significativamente maior quando comparado com o grupo TR. O grupo OTR/down apresentou uma diminuição significativa na ingestão alimentar da semana 0 para semana 4 e da semana 0 para a semana 8. Já o grupo OTR/up também apresentou uma queda significativa na ingestão alimentar da semana 0 para 4, porém não houve diferença para a semana 8 em relação as outras duas semanas. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre as semanas.

A figura 2C mostra a média da ingestão alimentar de cada grupo experimental ajustada pelo peso corporal. Na semana 0, os grupos não diferiram entre si. Na semana 4, o grupo OTR/down e OTR apresentaram diferença significativa em relação ao grupo TR na mesma semana. O grupo OTR também apresentou diferença quando comparado ao grupo CT. Em relação a semana 8, todos os grupos apresentaram valores menores significativamente quando comparado ao grupo N. Os grupos CT, OTR/up e OTR diferiram significativamente em relação ao grupo TR também na semana 8. Todos os grupos, exceto o OTR/up apresentaram diferença significativa na média da semana 0 para semana 4, e somente os grupos N e OTR diferiram da semana 4 para a semana 8.

A figura 3A mostra que a alteração (%) do desempenho no teste de rotarod da semana 0 para a semana 4 não foi significativamente diferente entre os grupos experimentais. Da semana 4 para a semana 8, todos os grupos OT diminuíram seu desempenho em comparação com os grupos CT e TR. Além disso, o grupo OTR apresentou valores significativamente menores quando comparado com o grupo OTR/down. A figura 3B mostra que as alterações (%) do desempenho no teste incremental da semana 0 para a semana 4 foram significativamente maiores para os grupos OTR/down e OTR comparado com o grupo CT.

Da semana 4 para a semana 8, enquanto o grupo TR aumentou sua *performance* significativamente quando comparado com os grupos OTR/down, OTR/up e OTR, o grupo OTR/down e OTR tiveram queda da *performance* quando comparado com o grupo CT.

A figura 3C mostra que a alteração (%) do desempenho no teste exaustivo da semana 0 para a semana 4 para os grupos TR e OTR/up foi significativamente maior quando comparado com o grupo CT. Além disso, o grupo TR teve aumento significativo da *performance* quando comparado com o grupo OTR/down. Da semana 4 para a semana 8, todos os grupos OT demonstraram queda significativa de seu desempenho quando comparado com os grupos CT e TR. A figura 3D mostra as alterações (%) do teste de força de preensão. Da semana 0 para a semana 4, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Da semana 4 para a semana 8, todos os grupos OT tiveram queda de *performance* quando comparados com os grupos CT e TR.

Proteínas relacionadas ao estresse do RE e apoptose no fígado

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para os níveis de proteínas hepáticas de BiP, pIRE1 (Ser724), pPERK (Thr981), peIF2alpha (Ser52) e GRP94 (Figuras 4A-4D e 4F, respectivamente). A figura 4E mostra que os níveis hepáticos da proteína ATF6beta foram significativamente menores nos grupos OTR/down, OTR/up e OTR quando comparados com o grupo N. Além disso, os grupos OTR/down e OTR/up tiveram níveis significativamente menores quando comparados com o grupo CT. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para as proteínas CHOP, caspase-4 clivada, caspase-12 clivada, pBax (Ser184) e pTRAF2 (Ser11) (Figuras 5A e 5C-5F, respectivamente). A figura 5B demonstra que a caspase 3 clivada foi significativamente menor no grupo OTR/down quando comparada com o grupo CT.

Proteínas relacionadas ao estresse do RE e apoptose no coração

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para os níveis de proteínas cardíacas de BiP, pIRE1 (Ser724), pPERK (Thr981), peIF2alpha (Ser52), ATF6beta and GRP94 (Figuras 6A-6F, respectivamente). Além disso, as proteínas CHOP, caspase-3 clivada, caspase-4 clivada, caspase-12 clivada, pBax (Ser184) and pTRAF2 (Ser11) não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (Figuras 7A-7F, respectivamente).

Proteínas relacionadas a inflamação no fígado e coração

Não houve diferença significativa entre os grupos N, CT, TR, OTR/down, OTR/up e OTR para os níveis proteicos de pSAPK-JNK (Thr 183-185) e pIKK (Ser 180-181 alfa/beta) no fígado (Figura 8A e 8B), assim como as proteínas pSAPK-JNK (Thr 183-185) e pIKK (Ser 180-181 alfa/beta) no coração não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 8C e 8D)

Figura 2. Parâmetros metabólicos; (2A) peso corporal; (2B) ingestão alimentar; (2C) média ingestão/peso.

Legenda: Os dados correspondem a média $\pm$ erro padrão de $n = 5$ camundongos. Naíve (N; sedentários), Controle (CT; sedentários que realizam os testes físicos), Treinado (TR; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em alicive (OTR/up; submetidos ao protocolo de *overtraining* em alicive) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). * $P < 0.05$ vs. grupo CT. ** $P < 0.05$ vs. grupo TR. *** $P < 0.05$ vs. grupo N.

Figura 3. Alterações em porcentagem (%) do teste de rotarod (3A), teste incremental (3B), teste exaustivo (3C) e teste de força de preensão (3D) da semana 0 a semana 4 e da semana 4 a semana 8.

Legenda: Os dados correspondem a média $\pm$ erro padrão de $n = 10$ camundongos. Controle (CT; sedentários que realizam os testes físicos), Treinado (TR; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em alicive (OTR/up; submetidos ao protocolo de *overtraining* em alicive) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). *P < 0.05 vs. grupo CT. **P < 0.05 vs. grupo TR. †P < 0.05 vs. grupo OTR/down.

Figura 4. Níveis proteícos (unidades arbitrárias) de BiP (A), pIRE1 (Ser724)/IRE1 (B), pPERK (Thr981)/PERK (C), peIF2alpha (Ser52)/eIF2alpha (D), ATF6beta (E) e GRP94 (F) mensurados no fígado dos animais experimentais.

Legenda: Os dados correspondem a média $\pm$ erro padrão de $n = 5$ camundongos. Naíve (N; sedentários), Controle (CT; sedentários que realizam os testes físicos), Treinado (TR; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em alicive (OTR/up; submetidos ao protocolo de *overtraining* em alicive) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). * $P < 0.05$ vs. grupo CT. *** $P < 0.05$ vs. grupo N. Os experimentos originais estão disponíveis no arquivo suplementar 1 (BiP, peIF2alpha, eIF2alpha e ATF6beta), arquivo 2 (pIRE1, IRE1, pPERK e PERK) e arquivo 3 (GRP94).

Figura 5. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de CHOP (A), Caspase-3 Clivada/Caspase-3 (B), Caspase-4 (C), Caspase-12 Clivada/Caspase-12 (D), pBax (Ser184)/Bax (E) e pTRAF2 (Ser11)/TRAF2 (F) mensurados no fígado dos animais experimentais.

Legenda: Os dados correspondem a média $\pm$ erro padrão de $n = 5$ camundongos. Naíve (N; sedentários), Controle (CT; sedentários que realizam os testes físicos), Treinado (TR; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em alicive (OTR/up; submetidos ao protocolo de *overtraining* em alicive) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). * $P < 0.05$ vs. grupo CT. Os experimentos originais estão disponíveis no arquivo suplementar 3 (pBax and Bax), arquivo 4 (CHOP e pTRAF2), arquivo 5 (Caspase-12 Clivada e Caspase-12), arquivo 6 (Caspase-3 Clivada, Caspase-3 e TRAF2) e arquivo 7 (Caspase-4).

Figura 6. Níveis proteícos (unidades arbitrárias) de BiP (A), pIRE1 (Ser724)/IRE1 (B), pPERK (Thr981)/PERK (C), peIF2alpha (Ser52)/eIF2alpha (D), ATF6beta (E) e GRP94 (F) mensurados no coração dos animais experimentais.

Legenda: Os dados correspondem a média $\pm$ erro padrão de $n = 6$ camundongos. Naíve (N; sedentários), Controle (CT; sedentários que realizam os testes físicos), Treinado (TR; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em alicive (OTR/up; submetidos ao protocolo de *overtraining* em alicive) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Os experimentos originais estão disponíveis no arquivo suplementar 8 (ATF6beta), arquivo 9 (pPERK e PERK), arquivo 10 (BiP, pIRE1 e IRE1), e arquivos 11 e 12 (peIF2alpha, eIF2alpha e GRP94).

Figura 7. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de CHOP (A), Caspase-3 Clivada/Caspase-3 (B), Caspase-4 (C), Caspase-12 Clivada/Caspase-12 (D), pBax (Ser184)/Bax (E) e pTRAF2 (Ser11)/TRAF2 (F) mensurados no coração dos animais experimentais.

Legenda: Os dados correspondem a média $\pm$ erro padrão de $n = 6$ camundongos. Naíve (N; sedentários), Controle (CT; sedentários que realizam os testes físicos), Treinado (TR; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em aclone (OTR/up; submetidos ao protocolo de *overtraining* em aclone) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Os experimentos originais estão disponíveis no arquivo suplementar 9 (Caspase-4, Caspase-12 and Caspase-12), arquivo 10 (CHOP), arquivos 11 e 12 (Caspase-3 Clivada, Caspase-3, pBax e BAX), arquivo 13 (TRAF2) e arquivo 14 (pTRAF2).

Figura 8. Níveis proteicos (unidades arbitrárias) de pSAPK-JNK (Thr183-185)/SAPK-JNK (A), pIKK (Ser180-181)/IKK (B) mensuradas no fígado, pSAPK-JNK (Thr183-185)/SAPK-JNK (C), pIKK (Ser180-181)/IKK (D) mensurados no coração, dos animais experimentais.

Legenda: Os dados correspondem a média $\pm$ erro padrão de $n = 5$ e $n=6$ camundongos, respectivamente. Naíve (N; sedentários), Controle (CT; sedentários que realizam os testes físicos), Treinado (TR; submetidos ao protocolo de treinamento), *Overtraining* em declive (OTR/down; submetidos ao protocolo de *overtraining* em declive), *Overtraining* em aclone (OTR/up; submetidos ao protocolo de *overtraining* em aclone) e *Overtraining* sem inclinação (OTR; submetidos ao protocolo de *overtraining* sem inclinação). Os experimentos originais estão disponíveis no arquivo suplementar 4 (pIKK), arquivo 7 (pSAPK-JNK), arquivos 13 (pIKK e IKK), arquivo 14 (pSAPK-JNK e SAPK-JNK) e arquivo 15 (SAPK e IKK).

7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente trabalho investigou os efeitos dos diferentes protocolos de OT sobre as proteínas hepáticas e cardíacas relacionadas ao estresse do RE, apoptose e inflamação em camundongos C57BL/6. Primeiramente, observou-se ganho de peso corporal para todos os grupos no decorrer das 8 semanas e o grupo OTR/down demonstrou menor ingestão alimentar ao final da semana 8. Em segundo lugar, observamos que os modelos de OT induziram respostas semelhantes nos testes de rotarod, incremental, exaustivo e de força de preensão. Em seguida, os grupos OT apresentaram valores significativamente menores de ATF6 β hepática em comparação com o grupo N. O grupo OTR/down apresentou menor valor da caspase-3 clivada no fígado quando comparado com o grupo CT. Finalmente, as proteínas cardíacas relacionadas ao estresse do RE e apoptose não foram moduladas em resposta aos protocolos de TR e OT.

O hipotálamo, centro regulador de energia do sistema nervoso central, é responsável por diversas funções, uma delas o controle alimentar. Sabe-se que altos níveis hipotalâmicos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão associados a uma menor ingestão alimentar (Ropelle *et al.*, 2009; Cintra *et al.*, 2012). Pereira *et al.* (2015) verificaram que o protocolo de OT baseado em contrações excêntricas induziu a um quadro de inflamação hipotalâmica transitória (Pereira, Da Rocha, *et al.*, 2015), o que justificaria a menor ingestão do grupo OTR/down no presente trabalho. Entretanto, a maior ingestão visualizada no grupo OTR/up pode ser explicada devido ao tipo de exercício (subida) gerar maior gasto energético quando comparado ao exercício de corrida na descida (J. Mark Davis, 2007). Já a maior ingestão também apresentada pelo grupo OTR pode ser justificada a partir dos dados apresentados por Rocha *et al.* (2015), em que o grupo OTR apresentou um maior volume de treino (minutos) no final da semana 8 em relação aos outros grupos (OTR/down e OTR/up) (Da Rocha *et al.*, 2015).

Os protocolos de TR e OT apresentam as mesmas características durante as primeiras quatro semanas. Com relação aos testes de rotarod e de força de preensão da semana 0 à semana 4, os modelos TR e OT não induziram alterações significativas em relação ao grupo CT. Da semana 4 à semana 8, enquanto o protocolo de TR não melhorou o desempenho nos testes de rotarod e de força de preensão, os modelos de OT alteraram esses parâmetros de capacidade funcional conforme verificado anteriormente (Da Rocha *et al.*, 2015; Pereira, Lucas, *et al.*, 2015; Da Rocha, Pereira, *et al.*, 2016; Pereira, Da Rocha, Pinto, Pauli, Moura, *et*

al., 2016). Usando o mesmo protocolo do grupo TR, outros pesquisadores não encontraram melhora nos testes de rotarod e força de preensão (Bueno *et al.*, 2010; Bueno Junior *et al.*, 2012). O teste de rotarod avalia disfunções cerebelares em roedores e pode ser influenciado pela resistência cardiorrespiratória, coordenação motora e aprendizagem (Caston *et al.*, 1995). Como o grupo TR aumentou os resultados no teste de carga incremental, um parâmetro de resistência cardiorrespiratória, da semana 4 à semana 8, é possível que este protocolo particular não tenha levado a alterações significativas de coordenação motora ou de aprendizagem.

Huang *et al.* (2013) observaram que o protocolo de corrida realizado a 70% do consumo máximo de oxigênio aumentou os valores do teste de rotarod, que foi associado com a maior regulação da densidade dendrítica das células de Purkinje, um marcador de coordenação motora (Huang *et al.*, 2013). As respostas aos testes incremental e exaustivo nos modelos de OT da semana 4 para a semana 8 estão de acordo com outras investigações realizadas pelo nosso grupo de pesquisa (Da Rocha *et al.*, 2015; Pereira, Da Rocha, *et al.*, 2015; Pereira, Lucas, *et al.*, 2015; Da Rocha, Pereira, *et al.*, 2016; Pereira, Da Rocha, Pinto, Pauli, Moura, *et al.*, 2016) e reforçam a eficiência desses protocolos em induzir o NFOR. Em relação as proteínas hepáticas do estresse do RE, visualizou-se uma menor ativação dos níveis da proteína ATF6 em resposta aos protocolos de OT. O ATF6 é um fator de transcrição ligado a membrana do RE que inibe a atividade de transcrição da *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) para reduzir os estoques de lipídio no fígado (Zhang *et al.*, 2015).

A SREBP-1c é o principal fator de transcrição que regula a síntese de triglicerídeos hepáticos, contribuindo para a patogênese da esteatose (Horton *et al.*, 2002). Como o estresse do RE pode aumentar a transcrição e a forma madura do SREBP-1c, este fenômeno fisiológico tem sido considerado um ativador da lipogênese hepática (Kammoun *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012). A interação da SREBP-1 precursora com a SREBP *cleavage-activating protein* (SCAP) leva a criação de um complexo com a *insulin-induced gene 1* (INSIG1) e INSIG2 a qual detém o SREBP-1 na membrana do RE. Após a estimulação da insulina, o SREBP-1 sofre ação de duas proteases no aparelho de Golgi, as mesmas proteases que agem sobre a ATF6, libertando a forma madura da SREBP-1 (mSREBP-1), que acarreta à expressão de vários genes lipogênicos (Brown, 1997; Ferré, 2010). Usui *et al.* (2012) verificaram que ratos obesos nulos em ATF6alfa apresentaram uma expressão elevada de RNAm de SREBP-1c, que estava ligada a uma tendência para um grau mais elevado de esteatose hepática (Usui *et al.*, 2012). Yamamoto *et al.* (2010) sobrecarregaram camundongos

C57BL/6 *knockout* em ATF6 α com uma injeção intraperitoneal de tunicamicina (1 μ g/g de peso corporal), um promotor do estresse do RE, e observaram que o nível de alanina aminotransferase, um índice de lesão hepática, foi aumentado mais de duas vezes no soro dos animais ATF6 $^{-/-}$ em comparação com os animais ATF6 $^{+/+}$, indicando que a lesão no fígado induzida pela tunicamicina é específica dos animais ATF6 $^{-/-}$. Também observou-se que os níveis de triglicerídeos e colesterol no fígado dos animais knockout estavam aumentadas quando comparado com o grupo ATF6 $^{+/+}$ (Yamamoto *et al.*, 2010).

Já a SREBP2 regula a colesterogênese e lipogênese *in vivo* e *in vitro*. O aumento na expressão da SREBP2 em ratos transgênicos resultou em gordura hepática com aumento dos éster de colesterol (Zeng *et al.*, 2004). Zeng *et al.* (2004) propuseram um modelo no qual a inanição de glicose induz a clivagem proteolítica de ATF6 que se liga a SREBP2 no núcleo e regula negativamente a lipogênese (Zeng *et al.*, 2004).

Recentemente, verificou-se que os protocolos de OTR/down e OTR/up regularam positivamente a SREBP1 p125 precursora, mas não a forma p68 madura. Além disso, todos os protocolos de OT induziram ao acúmulo de gordura hepática (Da Rocha, Pinto, *et al.*, 2016). Baseados nos estudos descritos previamente (Zeng *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2010; Usui *et al.*, 2012), estudos futuros deveriam verificar os efeitos dos modelos de OT nos níveis hepáticos de ATF6 α e SREBP2, assim como modelos *knockout* em ATF6 α e beta, uma vez que essas duas isoformas tem papéis diferentes no estresse do RE (Thuerauf *et al.*, 2004). As respostas da ATF6 hepática aos protocolos de exercício são escassas (Chapados e Lavoie, 2010; Tang *et al.*, 2016). Por exemplo, Chapados *et al.* (2010) não observaram diferenças significativas na expressão do gene ATF6 após seis semanas de corrida contínua, com duração de 60 minutos, a 26 m/min e inclinação de 10%, em ratas fêmeas Sprague-Dawley (Chapados e Lavoie, 2010). Tang *et al.* (2016) verificaram que sete dias sucessivos de exercício intenso (28 m/min durante 90 minutos) aumentou a atividade dos níveis de ATF6 no fígado de camundongos BALB/C (Tang *et al.*, 2016). As diferenças entre os protocolos de exercício, os animais de experimentação e os tempos de extração do fígado dificultam as comparações entre as pesquisas acima.

A apoptose é um processo fisiológico em que células normais podem morrer sob condições desfavoráveis ou de estresse, que está envolvida com diversas doenças como desordens hepáticas e neurodegenerativas (Breckenridge *et al.*, 2003). Prolongando o estresse do RE, há ativação do sinal apoptótico através da UPR. Durante o estresse, ocorrem distúrbios no potencial da membrana mitocondrial e no efluxo de cálcio, levando a liberação do citocromo C e formação do complexo apoptossomo com a Apaf1 e caspase 9. Este

complexo ativa as caspases executoras, como caspase 3 e caspase 7, e a caspase 12 (Mikami *et al.*, 2004; Ascensao *et al.*, 2011; Ascensao *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014; Santos-Alves *et al.*, 2014). Em relação às proteínas apoptóticas hepáticas, verificou-se uma menor regulação da caspase-3 clivada após o protocolo de OTR/down. Além disso, várias investigações não observaram alterações significativas dos níveis hepáticos da caspase-3 clivada após diferentes protocolos de exercício agudo e crônico (Mikami *et al.*, 2004; Ascensao *et al.*, 2011; Ascensao *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014; Santos-Alves *et al.*, 2014). Apenas dois estudos examinaram os efeitos de sessões exaustivas sobre o conteúdo hepático desta proteína apoptótica (Mikami *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2013). Mikami *et al.* (2004) avaliaram a atividade da caspase 3 no fígado de animais sedentários e de animais submetidos a corrida em esteira durante 60 min, 5 vezes na semana durante 4 semanas, a uma velocidade de 25 m/min com 0% de inclinação e não observaram uma alteração significativa dos níveis hepáticos da caspase 3 clivada (Mikami *et al.*, 2004). Huang *et al.* (2013) utilizou de exercícios exaustivos na esteira para estudar os efeitos do cogumelo medicinal na hepatoproteção, porém não compararam o conteúdo da caspase 3 clivada no fígado com o grupo sedentário (Huang *et al.*, 2013).

Embora não significativa, os níveis hepáticos da caspase 12 clivada no grupo OTR/down foi 70% maior quando comparado com o grupo N. Recentemente, Ryoo (Ryoo, 2016) destacou a importância de se considerar a *timeline* dos eventos em que o estresse do RE induz a morte celular. Sabendo que as proteínas e seus alvos são fosforiladas em diferentes períodos (Kholodenko, 2006), estudos futuros deveriam avaliar o *time course* das proteínas hepáticas relacionadas ao estresse do RE e apoptose após os protocolos de OT para esclarecer se eles foram ativados antes ou depois do atual tempo de extração. Com base na relação entre o treinamento aeróbico, atenuação do estresse do RE cardíaco e a melhora da capacidade de exercício (Bozi *et al.*, 2016), também verificamos se a diminuição do desempenho induzida pelos protocolos de OT estaria ligada ao estresse do RE e apoptose em corações de camundongos. As proteínas cardíacas relacionadas com o estresse do RE e a apoptose não foram moduladas em resposta aos protocolos de TR e OT.

Murlasits *et al.* (Murlasits *et al.*, 2007) verificaram em ratos Sprague–Dawley com isquemia de reperfusão, o efeito do exercício físico sobre o estresse do RE. Os animais foram divididos em sedentários e treinados, submetidos a um protocolo de corrida em esteira, por 60 minutos em dias consecutivos a 0% de inclinação e com uma taxa de trabalho em torno de 70% do volume de oxigênio (Vo₂) máximo. Os resultados revelaram que o treinamento não alterou os níveis proteicos de BIP e GRP94 no miocárdio, assim como não resultou em uma

redução significativa de CHOP e caspase 12. Os autores enfatizaram que a análise das proteínas do estresse do RE aconteceram após 24h da última sessão do exercício, sendo possível que o pico da expressão das proteínas teria ocorrido em um momento de tempo posterior, que pode ter sido perdido no estudo. Já Bourdier *et al.* (2016) submeteram ratos Wistar machos ao treinamento de alta intensidade por 10 dias, que consistia em 2 sessões de 24 minutos de exercício intercalado por 30 min de recuperação. A velocidade da esteira foi ajustada para 15 m/min para o primeiro momento e correspondia a um aquecimento de 6 min (50% da velocidade máxima) seguido por seis *steps* de 3 min com intensidade aumentada até atingir 30 m/min (correspondendo a 65%, 70%, 75%, 80%, 85% e 90% da velocidade máxima), e verificaram aumento nos níveis cardíacos de BiP, mas sem alterações significativas de pPERK, peIF2alpha, ATF4, ATF6, XBP1, CHOP e caspase-3 clivada (Bourdier *et al.*, 2016). O intervalo de tempo entre a última sessão de exercício e a extração do músculo cardíaco realizado por Bourdier *et al.* (Bourdier *et al.*, 2016) foi menor em comparação com o presente estudo (24h *versus* 36h). Na verdade, selecionou-se 36h de recuperação após o teste de força de preensão para garantir um período mínimo que permitisse que as vias de sinalização afetadas pelo exercício recuperassem seus níveis basais.

Embora o treinamento aeróbio moderado ou de alta intensidade possa reduzir o estresse do RE cardíaco induzido por insuficiência cardíaca pós-infarto do miocárdio ou por hipóxia intermitente (Bourdier *et al.*, 2016; Bozi *et al.*, 2016), respectivamente, seus efeitos em corações saudáveis são mínimos. Até o momento, esta é a primeira investigação sobre os efeitos do OT sobre as proteínas hepáticas e cardíacas relacionadas ao estresse do RE e apoptose. Conclui-se que os níveis hepáticos da ATF6beta foram menores em todos os grupos submetidos aos protocolos de OT, o que possivelmente está relacionado com o maior conteúdo de gordura hepática, e a caspase-3 clivada foi menor no grupo OTR/down. As proteínas relacionadas ao estresse do RE e apoptose não foram moduladas no coração, então acredita-se que a diminuição da performance induzida pelos nossos protocolos de OT não esta associada com o estresse do RE e apoptose no coração de camundongos. Estes resultados estão resumidos na figura 9.

Figure 9. Modelo esquemático resumizando a relação entre estresse do RE, apoptose e excesso de treinamento no fígado e coração de camundongos C57BL/6.

Fonte: próprio autor

8. ATIVIDADES REALIZADAS

Completo-se os créditos exigidos pelo programa para o depósito da dissertação (20 créditos).

Realizou-se o estágio PAE, na matéria de Fisiopatologia Materno Infantil, pela Faculdade de Nutrição e Metabolismo.

Ministrou, junto com outros alunos de mestrado do presente laboratório, um curso de capacitação para alunos do 1º ano da Escola de Educação Física e Esporte, no intuito de que eles conhecessem como funciona a parte prática do laboratório, assim como a linha de pesquisa do mesmo.

Participou como avaliadora do SICUSP nos anos de 2015 e 2016.

Apresentou os resultados parciais do trabalho intitulado “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.

Apresentou o trabalho intitulado “Overtraining is associated with endoplasmic reticulum stress in the hypothalamus of mice” no Symposium Behavioural, Autonomic and Neuroendocrine Mechanisms Regulating Homeostasis: A Lifelong Perspective em 25 a 27 de agosto de 2016.

Aprovada no exame de qualificação realizado no dia 15 de junho de 2016.

Colaborou, participou e executou de projetos realizados no presente laboratório, a qual quatro artigos foram publicados (doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.037>; 10.1530/JOE-16-0063; 10.1002/jcp.25625; 10.1139/apnm-2016-0542), dois aceitos na revista Motriz (Hypothalamic endoplasmic reticulum stress of overtrained mice after recovery; Nonfunctional overreaching and hepatic adaptations of APPL1 and APPL2) e outros submetidos.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6834839096391775>

REFERÊNCIAS

ASCENSAO, A. et al. Endurance training and chronic intermittent hypoxia modulate in vitro salicylate-induced hepatic mitochondrial dysfunction. **Mitochondrion**, v. 12, n. 6, p. 607-16, Nov 2012. ISSN 1872-8278 (Electronic) 1567-7249 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23069012> >.

ASCENSAO, A. et al. Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. **Clinical Science**, v. 120, n. 1-2, p. 37-49, Jan 2011. ISSN 0143-5221.

B'CHIR, W. et al. The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. 16, p. 7683-99, Sep 2013. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804767> >.

BIRRER, D. Prevalence of non-functional overreaching and the overtraining syndrome in Swiss elite athletes. **Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin und Sporttraumatologie**, v. 61, n. 4, p. 6, 2013.

BODEN, G. Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation? **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 518-9, Mar 2009. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246600> >.

BOURDIER, G. et al. High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 310, n. 2, p. H279-89, Jan 15 2016. ISSN 1522-1539 (Electronic) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26566725> >.

BOZI, L. H. et al. Aerobic exercise training rescues cardiac protein quality control and blunts endoplasmic reticulum stress in heart failure rats. **J Cell Mol Med**, Jun 16 2016. ISSN 1582-4934 (Electronic) 1582-1838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27305869> >.

BRADFORD, M. M. A. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 6, 1976.

BRECKENRIDGE, D. G. et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8608-18, Nov 24 2003. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634622> >.

BROWN, M. S. G., J. L. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v. 89, n. 3, 1997.

BUENO, C. R., JR. et al. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **J Appl Physiol** (1985), v. 109, n. 3, p. 702-9, Sep 2010. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595538> >.

BUENO JUNIOR, C. R. 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 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029189> >.

CAI, M. et al. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise. **Brain Behav Immun**, v. 57, p. 347-59, Oct 2016. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189035> >.

CASTON, J.; JONES, N.; STELZ, T. Role of preoperative and postoperative sensorimotor training on restoration of the equilibrium behavior in adult mice following cerebellectomy. **Neurobiol Learn Mem**, v. 64, n. 3, p. 195-202, Nov 1995. ISSN 1074-7427 (Print) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564373> >.

CHAPADOS, N. A.; LAVOIE, J. M. Exercise training increases hepatic endoplasmic reticulum (er) stress protein expression in MTP-inhibited high-fat fed rats. **Cell Biochem Funct**, v. 28, n. 3, p. 202-10, Apr 2010. ISSN 1099-0844 (Electronic) 0263-6484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20373467> >.

CHENG, Y. J. et al. Antagonistic Interaction Between Cordyceps sinensis and Exercise on Protection in Fulminant Hepatic Failure. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 42, n. 5, p. 1199-1213, 2014. ISSN 0192-415X.

CINTRA, D. E. et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30571, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279596> >.

DA LUZ, G. et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 9, p. 2015-23, Sep 2011. ISSN 1439-6327 (Electronic) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21249392> >.

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 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26445495> >.

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 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26381504> >.

DA ROCHA, A. L. et al. Exhaustive Training Leads to Hepatic Fat Accumulation. **J Cell Physiol**, Sep 29 2016. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27685953> >.

DARA, L.; JI, C.; KAPLOWITZ, N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. **Hepatology**, v. 53, n. 5, p. 1752-63, May 2011. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21384408> >.

DELDICQUE, L. Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: any contribution to sarcopenia? **Front Physiol**, v. 4, p. 236, 2013. ISSN 1664-042X (Electronic) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24027531> >.

DELDICQUE, L. et al. Endurance training in mice increases the unfolded protein response induced by a high-fat diet. **J Physiol Biochem**, v. 69, n. 2, p. 215-25, Jun 2013. ISSN 1877-8755 (Electronic) 1138-7548 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23011781> >.

DENG X, P. X., CHENG C, LIU B, ZHANG H, ZHANG Y, XU K. Regulation of SREBP-2 intracellular trafficking improves impaired autophagic flux and alleviates endoplasmic reticulum stress in NAFLD. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 3, p. 13, 2016.

EIZIRIK, D. L.; CARDOZO, A. K.; CNOP, M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. **Endocr Rev**, v. 29, n. 1, p. 42-61, Feb 2008. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048764> >.

FERRÉ, P. F., F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 12, 2010.

FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760-5, Aug 2007. ISSN 0305-1870 (Print) 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600553> >.

FRY, R. W.; MORTON, A. R.; KEAST, D. Overtraining in Athletes - an Update. **Sports Medicine**, v. 12, n. 1, p. 32-65, Jul 1991. ISSN 0112-1642.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125-1131, May 2002. ISSN 0021-9738.

HUANG, C. C. et al. Ganoderma tsugae Hepatoprotection against Exhaustive Exercise-Induced Liver Injury in Rats. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1741-1754, Feb 2013. ISSN 1420-3049.

HUMMASTI, S.; HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. **Circ Res**, v. 107, n. 5, p. 579-91, Sep 3 2010. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814028> >.

J. MARK DAVIS, E. A. 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. 5, 2007.

KAMMOUN, H. L. et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, p. 1201-1215, May 2009. ISSN 0021-9738.

KANG, J. S. Exercise copes with prolonged stress-induced impairment of spatial memory performance by endoplasmic reticulum stress. **J Exerc Nutrition Biochem**, v. 19, n. 3, p.

191-7, Sep 2015. ISSN 2233-6834 (Print) 2233-6834 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527209> >.

KHOLODENKO, B. N. Cell-signalling dynamics in time and space. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 3, p. 165-76, Mar 2006. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482094> >.

KIM, H. J. et al. Endoplasmic reticulum stress markers and ubiquitin-proteasome pathway activity in response to a 200-km run. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 1, p. 18-25, Jan 2011. ISSN 1530-0315 (Electronic) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473228> >.

KIM, K. et al. Effect of exercise intensity on unfolded protein response in skeletal muscle of rat. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 3, p. 211-6, Jun 2014. ISSN 1226-4512 (Print) 1226-4512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24976760> >.

KIM, M. K. et al. Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. **Exp Diabetes Res**, v. 2012, p. 509437, 2012. ISSN 1687-5303 (Electronic) 1687-5214 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474424> >.

KREHER, J. B.; SCHWARTZ, J. B. Overtraining syndrome: a practical guide. **Sports Health**, v. 4, n. 2, p. 128-38, Mar 2012. ISSN 1941-0921 (Electronic) 1941-0921 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016079> >.

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

LEE, J. S. et al. Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. **Toxicology Letters**, v. 211, n. 1, p. 29-38, May 20 2012. ISSN 0378-4274.

LEE, S. S.; YOO, J. H.; SO, Y. S. Effect of the low- versus high-intensity exercise training on endoplasmic reticulum stress and GLP-1 in adolescents with type 2 diabetes mellitus. **J Phys Ther Sci**, v. 27, n. 10, p. 3063-8, Oct 2015. ISSN 0915-5287 (Print) 0915-5287 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26644644> >.

MATOS, N. F.; WINSLEY, R. J.; WILLIAMS, C. A. Prevalence of nonfunctional overreaching/overtraining in young English athletes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 7, p. 1287-94, Jul 2011. ISSN 1530-0315 (Electronic) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131861> >.

MEEUSEN, R. et al. Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 1, p. 186-205, Jan 2013. ISSN 1530-0315 (Electronic) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23247672> >.

MIKAMI, T. et al. Endurance exercise training inhibits activity of plasma GOT and liver caspase-3 of mice [correction of rats] exposed to stress by induction of heat shock protein 70. **J Appl Physiol** (1985), v. 96, n. 5, p. 1776-81, May 2004. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075310> >.

MORGAN, W. P. O. C., P.J.; SPARLING, P.B. Psychological characterization of the elite female distance runner. **International Journal Sports Medicine**, v. 8, 1987.

MURLASITS, Z.; LEE, Y.; POWERS, S. K. Short-term exercise does not increase ER stress protein expression in cardiac muscle. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 9, p. 1522-8, Sep 2007. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17805084> >.

OAKES, S. A. et al. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 1, p. 105-10, Jan 4 2005. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613488> >.

ORDOÑEZ, R. M., J. L. Understanding Nutritional Interventions and Physical Exercise in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Current Molecular Medicine**, v. 15, p. 24, 2015.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-61, Oct 15 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486293> >.

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 17 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26480811> >.

PEREIRA, B. C. et al. Excessive eccentric exercise-induced overtraining model leads to endoplasmic reticulum stress in mice skeletal muscles. **Life Sci**, v. 145, p. 144-51, Jan 15

2016. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26707388> >.

PEREIRA, B. C. et al. Excessive training impairs the insulin signal transduction in mice skeletal muscles. **J Endocrinol**, May 17 2016. ISSN 1479-6805 (Electronic) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189188> >.

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 (Electronic) 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632058> >.

PEREIRA, B. C. et al. Eccentric Exercise Leads to Glial Activation but not Apoptosis in Mice Spinal Cords. **Int J Sports Med**, v. 36, n. 5, p. 378-85, May 2015. ISSN 1439-3964 (Electronic) 0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25665003> >.

PEREIRA, B. C. et al. Eccentric exercise leads to performance decrease and insulin signaling impairment. **Med Sci Sports Exerc**, v. 46, n. 4, p. 686-94, Apr 2014. ISSN 1530-0315 (Electronic) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002347> >.

PEREIRA, B. C. et al. Nonfunctional overreaching leads to inflammation and myostatin upregulation in swiss mice. **Int J Sports Med**, v. 35, n. 2, p. 139-46, Feb 2014. ISSN 1439-3964 (Electronic) 0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23868687> >.

PIROT, P. et al. Transcriptional regulation of the endoplasmic reticulum stress gene chop in pancreatic insulin-producing cells. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1069-77, Apr 2007. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395747> >.

RAGLIN, J. Overtraining and staleness: psychometric monitoring of endurance athletes. In: RN SINGER, M. M., L. T. (Ed.). **Handbook of Research on Sport Psychology**. New York: Macmillan, 1993. p.10.

RAYAVARAPU, S.; COLEY, W.; NAGARAJU, K. Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle homeostasis and disease. **Curr Rheumatol Rep**, v. 14, n. 3, p. 238-43, Jun 2012.

ISSN 1534-6307 (Electronic) 1523-3774 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410828> >.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 519-29, Jul 2007. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565364> >.

ROPELLE, E. R. et al. Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 10, p. 2341-51, May 15 2009. ISSN 1469-7793 (Electronic) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19332486> >.

RYOO, H. D. Long and short (timeframe) of endoplasmic reticulum stress-induced cell death. **FEBS J**, May 18 2016. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191701> >.

SADIGHI AKHA, A. A. et al. Heightened induction of proapoptotic signals in response to endoplasmic reticulum stress in primary fibroblasts from a mouse model of longevity. **J Biol Chem**, v. 286, n. 35, p. 30344-51, Sep 2 2011. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757703> >.

SANTOS-ALVES, E. et al. Exercise mitigates diclofenac-induced liver mitochondrial dysfunction. **Eur J Clin Invest**, v. 44, n. 7, p. 668-77, Jul 2014. ISSN 1365-2362 (Electronic) 0014-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24889192> >.

SEO, H. Y. et al. Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. **Endocrinology**, v. 149, n. 8, p. 3832-41, Aug 2008. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450959> >.

SMITH, L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med Sci Sports Exerc.**, v. 32, n. 2, p. 14, 2000.

STERN, S. E. Using Routine Clinical Measurements. **DIABETES**, v. 54, n. 3, p. 6, 2005.

TANG, Y. et al. Hepatoprotective Effect of Quercetin on Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation after Intense Exercise in Mice through Phosphoinositide 3-Kinase and Nuclear Factor-Kappa B. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 8696587, 2016. ISSN 1942-0994

(Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27504150> >.

THUERAUF, D. J.; MORRISON, L.; GLEMBOTSKI, C. C. Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction. **J Biol Chem**, v. 279, n. 20, p. 21078-84, May 14 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973138> >.

TURGEMAN, T. et al. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. **Neuromuscul Disord**, v. 18, n. 11, p. 857-68, Nov 2008. ISSN 0960-8966 (Print) 0960-8966 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672370> >.

USUI, M. et al. Atf6 alpha-null mice are glucose intolerant due to pancreatic beta-cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 61, n. 8, p. 1118-1128, Aug 2012. ISSN 0026-0495.

WU, J. et al. The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1alpha/ATF6alpha complex. **Cell Metab**, v. 13, n. 2, p. 160-9, Feb 2 2011. ISSN 1932-7420 (Electronic) 1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284983> >.

XUAN, B. et al. Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced cell death. **J Virol**, v. 83, n. 8, p. 3463-74, Apr 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193809> >.

YAMAMOTO, K. et al. Induction of Liver Steatosis and Lipid Droplet Formation in ATF6 alpha-Knockout Mice Burdened with Pharmacological Endoplasmic Reticulum Stress. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 17, p. 2975-2986, Sep 1 2010. ISSN 1059-1524.

YANG, H. T. et al. IL-15 expression increased in response to treadmill running and inhibited endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle in rats. **Endocrine**, v. 48, n. 1, p. 152-63, Feb 2015. ISSN 1559-0100 (Electronic) 1355-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24647688> >.

ZENG, L. et al. ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis. **EMBO J**, v. 23, n. 4, p. 950-8, Feb 25 2004. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14765107> >.

ZHANG, Q. et al. ER Stress and Autophagy Dysfunction Contribute to Fatty Liver in Diabetic Mice. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 5, p. 559-568, 2015. ISSN 1449-2288.

APÊNDICE 1

FIGADO

Experimento 1

Experimento 2

Experimento 3

APÊNDICE 2

FIGADO

Experimento 4

Experimento 5

Experimento 6

APÊNDICE 3

FIGADO

Experimento 7

Experimento 8

Experiment 9

APÊNDICE 5

FIGADO

Experimento 13

Experimento 14

Experimento 15

APÊNDICE 6

FIGADO

Experimento 13

Experimento 14

Experimento 15

APÊNDICE 7

FIGADO

Experimento 19

Experimento 20

Experimento 21

APÊNDICE 8

CORACAO
Experimento 1

Experimento 2

Experimento 3

Experimento 4

APÊNDICE 9

CORACAO
Experimento 5

Experimento 6

Experimento 7

Experiment 8

APÊNDICE 10

CORACAO
Experimento 9

Experimento 10

Experimento 11

Experimento 12

APÊNDICE 11

CORACAO

Experimento 13

Experimento 14

APÊNDICE 12

CORACAO

Experimento 15

Experimento 16

APÊNDICE 13

CORACAO
Experimento 17

Experimento 18

Experimento 19

Experimento 20

APÊNDICE 14

CORACAO
Experimento 21

Experimento 22

Experimento 23

Experimento 24

APÊNDICE 15

FIGADO

Experimento 22

Experimento 23

Experimento 24

Observação: o programa utilizado para elaboração dos apêndices não aceita acentos e ç

ANEXO 1

From: Frontiers Physiology Editorial Office
 To: Adelino Silva
 Date: Thu, 20 Oct 2016 at 5:42 PM (GMT)
 Subject: Manuscript Submitted
 Dear Dr Silva,

We are pleased to inform you that we have received the manuscript below, which will be considered for publication in Frontiers in Physiology, section Exercise Physiology.

Title: "EXCESSIVE TRAINING DOES NOT MODULATE MOST OF THE HEPATIC AND CARDIAC PROTEINS RELATED TO ER STRESS AND APOPTOSIS IN C57BL/6 MICE"
 Article type: Original Research
 Submitted By: Adelino Silva
 Submitted On: 20 Oct 2016

You can access the review forum and track the progress of your manuscript by

clicking here:

<http://frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Best Regards,

Your Frontiers in Physiology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
 EPFL Innovation Square, Building I, Lausanne, Switzerland
 Office T 41 21 510 17 25

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (frontiers.zendesk.com)

What do I need to do now?

At this moment: not much. You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you will then be able to read the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript, if necessary. In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

http://frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=415&name=exercise_physiology

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: http://frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf