UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos do *overtraining* induzido através de exercício em esteira rolante sem inclinação, em aclone e em declive, no conteúdo e ativação das proteínas das vias inflamatória e de sinalização da insulina em camundongos.

Bruno Cesar Pereira

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos do *overtraining* induzido através de exercício em esteira rolante sem inclinação, em aclone e em declive, no conteúdo e ativação das proteínas das vias inflamatória e de sinalização da insulina em camundongos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional para obtenção do Título de Mestre Ciências.

Aluno: Bruno Cesar Pereira

Orientador: Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva

Ribeirão Preto
2015

APOIO FINANCEIRO

FAPESP

(PROCESSO 2013/19985-7)

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.

Pereira, Bruno Cesar

Estudo dos efeitos do *overtraining* induzido através de exercício em esteira rolante sem inclinação, em aclone e em declive, no conteúdo e ativação das proteínas das vias inflamatória e de sinalização da insulina em camundongos. Ribeirão Preto, 2015. 98 p.: il.; 30 cm.

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

Orientador: Adelino Sanchez Ramos da Silva

1. *Overreaching* não funcional. 2. Inflamação. 3. via de sinalização da insulina . 3. Retículo endoplasmático

ATA DE DEFESA

Aluno: 17152 - 5744718 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Bruno Cesar Pereira no Programa: Reabilitação e Desempenho Funcional, do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 23 dias do mês de setembro de 2015, no(a) FMRP-USP realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Bruno Cesar Pereira, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Estudo dos efeitos do overtraining induzido através de exercício em esteira rolante sem inclinação, em active e em decline, no conteúdo e ativação das proteínas das vias inflamatória e de sinalização da insulina em camundongos"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Adelino Sanchez Ramos da Silva	Presidente	EEFERP - USP	<u>Aprovado</u>
Carlos Roberto Bueno Júnior	Titular	EEFERP - USP	<u>Aprovado</u>
Enrico Fuini Puggina	Titular	EEFERP - USP	<u>Aprovado</u>

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Ísis Sawasaki Silveira Leme, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 23 dias do mês de setembro de 2015.

Carlos Roberto Bueno Júnior
Carlos Roberto Bueno Júnior

Enrico Fuini Puggina
Enrico Fuini Puggina

Adelino Sanchez Ramos da Silva
Adelino Sanchez Ramos da Silva
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 23/09/2015 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Ciências obtido no Programa Reabilitação e Desempenho Funcional - Área de concentração: Fisioterapia.

Prof. Dr. João Santana da Silva
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
Prof. Dr. João Santana da Silva
Presidente da CPG - FMRP/USP

Ísis Sawasaki Silveira Leme
Ísis Sawasaki Silveira Leme
Técnico Acadêmico
SPG/FMRP-USP

Agradecimientos

Primeiramente a **Deus**, pela saúde, força e disposição que me foram concedidas perante todos os desafios, pessoais e profissionais, encontrados para a realização desta pesquisa.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (processo 2013/19985-7).

Ao meu orientador e amigo professor **Adelino Sanchez Ramos da Silva**, por me acompanhar desde o início de meu trabalho em 2010, durante iniciação científica e graduação, até por fim a me tornar mestre em ciências.

Ao nosso grupo de pesquisa que sempre esteve ao nosso lado com apoio intelectual, financeiro e prático, sendo esse composto pelos professores: Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza (UNESC - Criciúma), Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra (FCA - UNICAMP), Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle (FCA - UNICAMP), Profa. Dra. Ellen Cristini de Freitas (EEFERP -USP), Prof. Dr. Fábio Santos Lira (FCT - UNESP), Dra. Giovana Rampazzo Teixeira (FCT - UNESP), Prof. Dr. José Rodrigo Pauli (FCA - UNICAMP), Prof. Dr. Marcelo Papoti (EEFERP -USP).

A todos os laboratórios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) que se dispuseram a me ajudar em todas as dificuldades encontradas.

Ao meu parceiro de pesquisa e grande amigo **Alisson Luis da Rocha**, por me acompanhar em todos os experimentos práticos e dificuldades pessoais encontradas durante toda minha caminhada.

Aos meus amigos **Rodrigo Leal e Luiz Guilherme Gonçalves** por me acompanhar durante dias de extração tecidual sem esperar nada em troca e pela amizade sincera.

Ao meu amigo, que considero como irmão, **Micássio Fernandes de Andrade**, por me acompanhar em todos os momentos de minha vida sempre com sua paciência e benevolência e amizade sincera sobre qualquer situação.

Aos meus pais **Cicero Pereira e Sandra Mara Bernardes Pereira** por toda compreensão e apoio em todos os momentos de minha vida.

A minha amada esposa **Franciele Naous Pereira** por seu companherismo e amor sincero.

A minha filha **Esther Pereira** por ser a razão de tudo o que acredito e força para continuar trabalhando.

PEREIRA, B. C. **Efeitos do *overtraining* induzido através de exercício em esteira rolante sem inclinação, em aclone e em declive, no conteúdo e ativação das proteínas das vias inflamatória e de sinalização da insulina em camundongos.** 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O grande volume de treino, a intensidade e o componente excêntrico de um movimento associados com limitados períodos de recuperação conduzem ao *overreaching* não funcional (NFOR) que está associado com a inflamação e com o prejuízo do sinal da via da insulina. No entanto, até o presente momento, não é possível afirmar que o NFOR sem a predominância do exercício excêntrico (EE) está associado com as disfunções citadas anteriormente. Dessa maneira, o principal objetivo do presente estudo foi comparar os efeitos do NFOR em declive com outros dois protocolos de mesmo volume e intensidade, mas realizados sem inclinação e em aclone, nas concentrações séricas e no conteúdo das proteínas relacionadas ao estresse no retículo endoplasmático e às vias moleculares inflamatória e insulínica em músculos esqueléticos de camundongos. Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle (CT; sedentários), *Overtraining* (OT) em declive (OTR/down; submetidos ao protocolo de OT com corrida na descida), OT em aclone (OTR/up; submetidos ao protocolo de OT com corrida na subida) e OT sem inclinação (OTR; submetidos ao protocolo de OT com corrida sem inclinação). Os camundongos foram avaliados diariamente quanto à variação da massa corporal e ingestão alimentar. Ao final dos protocolos de OTR/down, OTR/up e OTR, os animais foram submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina e à glicose. O conteúdo das proteínas foram avaliados nos músculos extensor digital longo (EDL) e sóleo por meio da técnica de imunoblotting. O dano tecidual foi verificado por meio da técnica de histologia. Para a comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância seguida de teste para comparação múltipla de médias. Todos os protocolos de OT foram capazes de causar o estado de NFOR e independente do mecanismo de indução todos promoveram uma condição inflamatória aguda e injúria tecidual nos músculos EDL e sóleo. No entanto, o protocolo de OTR/down foi o único capaz de aumentar o conteúdo da maioria das proteínas relacionadas ao estresse no Retículo Endoplasmático (RE) e desencadear prejuízo na via de sinalização da insulina em ambas amostras do músculo esquelético analisadas. Assim, são necessários mais estudos para explicar, os efeitos dos protocolos em aclone e sem inclinação, na relação entre as vias inflamatória e de sinalização da insulina.

Palavras-chave: *Overreaching* não funcional, inflamação, via de sinalização da insulina, retículo endoplasmático.

Abstract

PEREIRA, B. C. Effects of overtraining induced by exercise in treadmill without inclination, uphill and downhill on the content and activation of proteins of insulin signaling pathway and inflammation in mice. 2015. Dissertation (Master) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The large training volume, intensity and eccentric component of a movement associated with limited rest periods lead to nonfunctional overreaching (NFOR) that is associated with inflammation and insulin signaling impairment. However, to date, it is not possible to state that NFOR induced without eccentric exercise (EE) predominance is associated with the previously mentioned disorders. Thus, the aim of the present investigation was to compare the effects of NFOR induced by EE with other two protocols with similar intensity and volume, but performed in uphill and without inclination on the cytokine serum levels and on the proteins from the inflammatory and insulenic molecular pathways and endoplasmic reticulum stress. The animals were divided into 4 groups: control (CT; sedentary), Overtraining in downhill (OTR/down; submitted to the OT protocol with downhill running), Overtraining in uphill (OTR/up; submitted to the OT protocol with uphill running) and Overtraining without inclination (OTR; submitted to the OT protocol performed in without inclination running). The mice were evaluated daily for the variation in body weight and food intake. At the end of the protocols OTR/down, OTR/up and OTR, the animals were be tested for intraperitoneal insulin tolerance and by glucose. The content of the proteins previously described were evaluated in the extensor digitorum longus and soleus muscles by the immunoblotting technique. Tissue damage was verified by histology technique. For comparison between groups were used variance analysis followed by test for multiple comparisons of means. We conclude that all OT protocols were capacity to induce nonfunctional overreaching state and regardless of the mechanism of induction promotes an acute inflammatory condition and damage tissue in the muscles extensor digitorum longus (EDL) and soleus in C57BLJ6 mice. However, the OTR/down protocol was the only one able to increase the content of most proteins related to the stress in the Endoplasmic Reticulum (ER) and trigger impaired insulin signaling pathway in both skeletal muscle samples analyzed. Thus, further studies are needed to explain the effects of protocols OTR/up and OTR on the relationship between the inflammatory pathways and insulin signaling.

Key words: Non Functional overreaching, inflammation, insulin signaling pathway, reticulum endoplasmic.

Lista de Abreviaturas

ACSM	<i>american college of sports medicine</i>
ANOVA	análise de variância
Akt	proteína quinase B
ASK1	<i>apoptosis signal regulating kinase 1</i>
ATF6	fator 6 ativador de transcrição
BiP	<i>binding protein</i>
DMT	dor muscular de início tardio
eIF2 α	<i>alfa subunit of eukaryotic initiation factor 2</i>
ERAD	degradação associada ao reticulo endoplasmático
ECSS	<i>European College of Sport Science</i>
EE	Exercício excêntrico
ERO	espécies reativas de oxigênio
EDL	Músculo extensor longo dos dedos
FOR	<i>Functional overreaching</i>
Fc γ R	receptor para a porção Fc de IgG
Glut 4	transportador de glicose insulino-sensível
GSH	glutathiona reduzida
GSSH	glutathiona oxidada
IKK $\alpha\beta$	Proteína quinase $\alpha\beta$
IRE1	enzima ativada por inositol 1
IFN γ	interferon γ
IgG	imunoglobulina da classe G
IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15	interleucinas 1, 6, 10, 12, 15
IR beta	receptor de insulina beta
IRS1	substrato do receptor de insulina 1

ITAM	imunorreceptor com motivo de ativação baseado em tirosina
ITIM	imunorreceptor com motivo de inibição baseado em tirosina
LFA-1	antígeno 1 associado a função linfocitária
JNK	c-jun-terminal kinase
mTOR	serina/treonina quinase de mamíferos alvo de rapamicina
MPO	mieloperoxidase
NOS	Espécies reativas de oxigênio
NF-κB	fator nuclear de transcrição κB
NFOR	<i>Nonfunctional overreaching</i>
OR	<i>Overreaching</i>
OT	<i>Overtraining</i>
OTR	<i>Overtraining without inclination</i>
OTR/down	<i>Ovetraining in downhill running</i>
OTR/up	<i>Ovetraining in uphill running</i>
OTS	<i>Overtraining syndrome</i>
PI3q	fosfatidilinositol 3-quinase
PERK	transmembrane protein kinase
RE	Retículo endoplasmático
ROS	espécies reativas de oxigênio
SAPK/JNK	<i>the stressactivated protein kinases/Jun amino-terminal kinases</i>
SOCS3	supressor de sinalização de citocina 3
SOD	superóxido dismutase
Src	família de proteínas tirosinas quinases
TRAF2	tumor necrosis fator receptor-associated fator 2
TNFα	fator de necrose tumoral tipo α

UPR	resposta a proteína não dobrada
XBP1	X Box Protein 1

Tabelas

Tabela 1	Características do Protocolo de <i>overtraining</i> em declive.	Pag. 43
Tabela 2	Características do Protocolo de <i>overtraining</i> em aclone.	Pag. 44
Tabela 3	Características do Protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação.	Pag. 45

Figuras

Figura 1	Abordagem experimental	Pag. 46
Figura 2	Avaliação do percentual de alterações nos testes de desempenho dos animais submetidos aos diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.53
Figura 3	Análise dos parâmetros metabólicos dos animais submetidos aos diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.55
Figura 4	Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e de SOC3 no músculo EDL dos animais submetidos ao diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.57
Figura 5	Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e de SOC3 no músculo Sóleo dos animais submetidos ao diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.59
Figura 6	Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro dos animais submetidos aos diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.61
Figura 7	Análise histológica dos músculos EDL e sóleo dos animais submetidos aos diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.63
Figura 8	Avaliação da sinalização de estresse no retículo endoplasmático do músculo EDL dos animais submetidos ao diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.65
Figura 9	Avaliação da sinalização de estresse no retículo endoplasmático do músculo Sóleo dos animais submetidos ao diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.67
Figura 10	Análise da via de sinalização da insulina nos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.69
Figura 11	Análise da sinalização inflamatória nos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes protocolos de <i>overtraining</i>	Pag.71
Figura 12	Demonstração esquemática dos resultados obtidos na presente dissertação	Pag.84

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1. Síndrome do <i>overtraining</i> (OTS), <i>Overtraining</i> (OT) e <i>Overreaching</i> (OR).....	28
2.2. O exercício físico e as alterações no sistema imunológico.....	30
2.3. O exercício físico e as alterações nas vias de sinalização do mTOR e da Insulina.....	32
2.4. Exercício físico e estresse no retículo endoplasmático	33
2. OBJETIVOS	37
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	40
3.1. Animais experimentais.....	41
3.2. Avaliação de parâmetros metabólicos	41
3.3. Avaliação do desempenho físico	41
3.3.1 Teste do rotarod.....	42
3.3.2 Teste exaustivo.....	42
3.3.3 Teste de força de preensão.....	42
3.3.4 Teste incremental.....	42
3.4. Protocolo de <i>overtraining</i> em declive.....	43
3.5. Protocolo de <i>overtraining</i> em aclone.....	44
3.6. Protocolo de <i>overtraining</i> sem inclinação.....	45
3.7. Abordagem experimental.....	46
3.8. Avaliação da tolerância intraperitoneal à insulina.....	46
3.9. Avaliação da tolerância intraperitoneal à glicose.....	47
3.10. Extração do músculo esquelético e coleta de sangue.....	47
3.10.1 Coleta de sangue total periférico e avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias.	48
3.11. Determinação do conteúdo de GLUT-4 na membrana plasmática	48
3.12. Técnica de immunoblotting	49
3.13. Análise histológica.....	49
3.13. Análise dos resultados.....	50

4. RESULTADOS.....	51
4.1. Avaliação dos parâmetros de desempenho dos animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais.....	52
4.2. Análise dos parâmetros metabólicos de animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais	54
4.3. Avaliação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e de SOCS3 no músculo EDL de animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais	56
4.4. Avaliação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e de SOCS3 no músculo Sóleo de animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais.....	58
4.5. Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro de animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais.....	60
4.6. Análise histológica dos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais.....	62
4.7. Avaliação do estresse no retículo endoplasmático de músculo EDL de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais.....	64
4.8. Avaliação do estresse no retículo endoplasmático de músculo Sóleo de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais.....	66
4.9. Análise da via de sinalização da insulina nos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais.....	68
4.10. Análise da sinalização inflamatória nos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais.....	70
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	85

1. Introdução

Os principais objetivos de um programa de treinamento são a maximização e a manutenção do desempenho físico ao longo de uma temporada competitiva (Armstrong e Vanheest, 2002). Para que isso ocorra, sessões de treino de alta intensidade são comumente utilizadas durante fases específicas da periodização. No entanto, esse processo de intensificação de treinamento pode acarretar em diminuição temporária de desempenho e aparecimento da fadiga aguda (Halsen e Jeukendrup, 2004). Assim, períodos adequados de recuperação são essenciais para que os atletas se beneficiem da supercompensação e melhorem seu desempenho. Contudo, se a diminuição temporária do desempenho físico e o aparecimento da fadiga aguda forem ignorados e os atletas mantiverem as cargas de treinamento, os mesmos podem apresentar um desequilíbrio entre a demanda do exercício e o período destinado à sua recuperação, o que pode ocasionar no aparecimento do *overreaching* (OR) e/ou *overtraining* (OT) (Halsen e Jeukendrup, 2004).

Recentemente, devido à inexistência de uma terminologia comum e consistente sobre essas disfunções, renomados pesquisadores associados ao *American College of Sports Medicine* (ACSM) e ao *European College of Sport Science* (ECSS) publicaram um trabalho de revisão de literatura cujo objetivo foi fornecer um consenso mútuo dessas duas respeitadas organizações internacionais sobre definições, diagnósticos, tratamentos e prevenções no que tange o OR e OT (Meeusen *et al.*, 2013). Dessa forma, na presente dissertação utilizou-se a mesma terminologia que foi proposta nesse trabalho (Meeusen *et al.*, 2013): *overreaching* funcional (FOR), *overreaching* não funcional (NFOR) e síndrome do *overtraining* (OTS). No FOR, também denominado de OR de curto prazo, o atleta é submetido a um período intensificado de treinamento que pode resultar em diminuição temporária de desempenho físico. Após um período adequado de recuperação, o atleta apresenta supercompensação, elevando os níveis de desempenho quando comparado a linha de base (Meeusen *et al.*, 2013). Além disso, as respostas fisiológicas irão compensar o estresse promovido pela intensificação do treinamento (Steinacker Jr, 2004).

Quando a estratégia de intensificação de treinamento é mantida, o atleta pode evoluir para o NFOR, também denominado de OR extremo, que está associado com a estagnação ou queda de desempenho físico, que pode ser revertida após semanas ou meses de recuperação, e está associada com distúrbios psicológicos e hormonais (Meeusen *et al.*, 2013). Por outro lado, a OTS é caracterizada por uma diminuição de desempenho físico que pode durar meses ou anos. Na realidade, devido à semelhança nas alterações clínicas e hormonais entre os estados de NFOR e OTS, o diagnóstico do último exige a exclusão de

uma série de fatores, inclusive de doenças, que podem estar influenciando a diminuição do desempenho e as alterações de humor (Meeusen *et al.*, 2013).

Os avanços nas áreas de estudos de FOR, NFOR e OTS são prejudicados devido à variabilidade dos desenhos experimentais e à falta de atletas dispostos a arriscarem uma temporada de treinamento e suas respectivas competições para contribuir com as pesquisas nessa área (Armstrong e Vanheest, 2002; Halson e Jeukendrup, 2004). Nesse sentido, a Sociedade Americana de Fisiologia incentiva a utilização de modelos animais quando não é apropriado estudar os efeitos do exercício físico nos seres humanos (Society, 2006). Recentemente, Pereira e colaboradores (Pereira *et al.*, 2012) desenvolveram um protocolo de OT baseado em sessões crônicas de corrida em declive que induziu o NFOR em camundongos. Posteriormente, com o intuito de investigar as relações entre a queda de desempenho induzida por sessões crônicas de exercício excêntrico (EE) e as hipóteses que consideram o papel central das citocinas na etiologia da OTS (Smith, 2000; Robson, 2003), Pereira e colaboradores (Pereira, B. C. *et al.*, 2013) verificaram que camundongos em NFOR apresentaram inflamação crônica de baixa intensidade tanto em músculos esqueléticos (altas concentrações protéicas de interleucina 6, IL-6, e do fator de necrose tumoral alfa, TNF-alfa) quanto em soro (altas concentrações de IL-6), além de altas concentrações protéicas de miostatina em amostras de músculo esquelético.

Como os altos níveis de IL-6, TNF-alfa e miostatina estão diretamente relacionados com o prejuízo da via de sinalização da insulina (Wei *et al.*, 2008; Hittel *et al.*, 2010; Guo T, 2009), Pereira e colaboradores (Pereira, B. C. *et al.*, 2013) investigaram os efeitos do protocolo de OT nos conteúdos proteicos e na fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1; pIRS1), do receptor de insulina beta (IRbeta; pIRbeta) e da proteína quinase B (Akt; pAkt) em músculos esqueléticos com diferentes predominâncias de fibras musculares glicolíticas e oxidativas. Além disso, outras proteínas como a I κ B kinase (IKK), um complexo enzimático relacionado com a resposta celular inflamatória, a SAPK/JNK (*the stressactivated protein kinases/Jun amino-terminal kinases*), membro da família das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), e o supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3), membro da família dos supressores de sinalização de citocina (SOCS), também estão relacionadas com o prejuízo da via de sinalização da insulina na musculatura esquelética (K *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2010; M *et al.*, 2012; Er *et al.*, 2013; Sb *et al.*, 2013).

Dessa forma, Pereira e colaboradores (Pereira, B. C. *et al.*, 2013) também objetivaram verificar se o protocolo de OT foi capaz de modular o conteúdo protéico e a

fosforilação dessas proteínas. Nesse último estudo (Pereira, B. C *et al.*, 2013), os autores constataram que o protocolo de OT baseado em EE prejudicou a transdução do sinal da via de sinalização da insulina com concomitante aumento dos níveis protéicos de IKK, SAPK/JNK e SOCS3. Recentemente, Gregor e Hotamisligil (Gregor Mf e Gs., 2011) exploraram a relação entre inflamação, prejuízo da via de sinalização da insulina e estresse do retículo endoplasmático. No entanto, estudos sobre os efeitos do NFOR induzido pelo EE no comportamento das proteínas do estresse do retículo endoplasmático ainda não foram realizados.

Em resumo, até o presente momento, nossos estudos demonstraram que a associação entre sessões crônicas de EE e períodos limitados de recuperação estão diretamente relacionados com a diminuição de desempenho físico, inflamação crônica de baixo grau e prejuízo da via de sinalização da insulina (Pereira *et al.*, 2012; Pereira, B. C *et al.*, 2013; Pereira, B. C. *et al.*, 2013). Contudo, é importante salientar que pesquisadores na área de imunologia do exercício têm utilizado uma série de protocolos experimentais com o objetivo de estudar a relação entre EE, dano muscular e aumento das concentrações sistêmicas e intramusculares de citocinas (Paulsen *et al.*, 2012). Além disso, já foi descrito que o dano muscular provocado pelo EE está associado com altas concentrações séricas de TNF-alfa (Lf *et al.*, 1999) que, por sua vez, estão relacionadas com o aumento da fosforilação em serina do IRS-1, e com a diminuição da associação entre o IRS-1 e a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q) e da fosforilação em serina da Akt, prejudicando a transdução do sinal da via de sinalização da insulina (Jp e Lf, 2003).

Dessa maneira, é possível afirmar que os nossos resultados (Pereira, B. C *et al.*, 2013; Pereira, B. C. *et al.*, 2013) corroboram com a literatura específica acerca dos efeitos do EE sobre a inflamação e a via de sinalização da insulina (Lf *et al.*, 1999; Jp e Lf, 2003; Paulsen *et al.*, 2012). No entanto, sabe-se que o conteúdo protéico de citocinas no músculo esquelético de camundongos é significativamente superior após uma única sessão de exercício físico realizado em declive (150min, 22m/min, -14%) em comparação com a mesma sessão realizada em aplane (Davis *et al.*, 2007). Portanto, embora o NFOR possa ser induzido em roedores utilizando o exercício físico em esteira rolante sem a predominância do EE (Hohl *et al.*, 2008), até o presente momento, não é possível afirmar que o NFOR induzido sem a predominância do EE está associado com a inflamação, prejuízo da transdução do sinal da via da insulina e com estresse no retículo endoplasmático.

Assim, os resultados da presente dissertação corroboram no entendimento dos mecanismos envolvidos com a etiologia e o desenvolvimento da síndrome do Overtraining.

2. Revisão de literatura

2.1 Síndrome do *overtraining* (OTS), *overtraining* (OT) e *Overreaching* (OR)

No esporte de alto nível, os principais objetivos de um programa de treinamento são a maximização e a manutenção do desempenho esportivo do atleta ao longo de uma temporada competitiva (Armstrong e Vanheest, 2002). Para que isso ocorra, sessões de treino de alta intensidade são comumente utilizadas durante programas de treinamento em diversas modalidades esportivas. No entanto, essas sessões podem acarretar momentaneamente diminuição de desempenho e aparecimento da fadiga aguda (Halsen e Jeukendrup, 2004). Nesse momento, é importante que a comissão técnica propicie ao atleta um período adequado de recuperação, para que o mesmo possa ser beneficiado pela supercompensação e conseqüentemente pela melhora do desempenho físico. Contudo, caso essa queda de desempenho seja combatida com mais treinamento, o atleta pode apresentar um desequilíbrio entre a demanda do exercício e o período destinado à sua recuperação (Halsen e Jeukendrup, 2004).

Está bem documentado que a densidade de trabalho e o componente excêntrico de um movimento, associados com limitados períodos de descanso culmina com o *overreaching* (OR) e *overtraining* (OT), e tem uma relação direta com a imunossupressão (Armstrong *et al.*, 1983; Peake *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2010; Piers *et al.*, 2011). Como o exercício excêntrico o OT induz microtrauma, iniciando uma resposta inflamatória sistêmica (Smith, 2000; 2003).

Meeusen e colaboradores (Meeusen *et al.*, 2006) propuseram uma nomenclatura particular aos parâmetros que desencadeiam o *overtraining*, como sendo: *functional overreaching* (FOR), caracterizado por uma queda de desempenho que não está relacionada com outros aspectos psicológicos e/ou fisiológicos negativos e pode ser revertida após alguns dias de recuperação; *non-functional overreaching* (NFOR), caracterizado por uma queda de desempenho que pode ser revertida após semanas ou meses de recuperação; e *overtraining syndrome* (OTS), caracterizado por uma queda de desempenho que pode perdurar durante meses ou anos. A diferenciação entre NFOR e OT é muito complexa, uma vez que ambos estão relacionados com o estado catabólico acentuado do metabolismo, alterações bioquímicas, fisiológicas, psicológicas e aumento da incidência de lesões e alterações dos estados de humor.

São descritas na literatura várias hipóteses no intuito de explicar NFOR e OT. Costill e colaboradores (Costill *et al.*, 1988) propuseram a hipótese do glicogênio, sugerindo que em resposta a um aumento dramático de intensidade e carga, alguns atletas

são incapazes de manter uma ingestão suficiente de calorias, em particular hidratos de carbono, e que isso resulta na redução de glicogênio muscular, e poderia ser responsável, em parte, por sensação de fadiga e redução de desempenho. Newsholme e colaboradores (Newsholme, E *et al.*, 1991) propuseram a teoria da glutamina, aminoácido extremamente importante no metabolismo das proteínas, para explicar NFOR e OT. As concentrações plasmáticas de glutamina diminuem progressivamente ao longo de 10 dias de intenso treinamento de corrida, resultando nos sintomas de OR (Keast *et al.*, 1995). A redução da glutamina arterial é responsável pela frequente resposta imunitária diminuída e aumento da taxa de infecção visto em OTS, uma vez que a glutamina é um combustível primário utilizado pelas células do sistema imune (Pedersen, 1997a; Pedersen, 1997b; Halson *et al.*, 2003). Mackinnon e colaboradores (Mackinnon, 2000) descreveram a síndrome de overtraining (OTS) como sendo um distúrbio neuroendócrino caracterizado por fraco desempenho em concorrência, a incapacidade de manter as cargas de treinamento, fadiga persistente, redução da excreção de catecolaminas, frequentes doenças, distúrbios do sono e alterações no estado de humor.

Para Foster e Lehman (Foster e Lehman, 1997) a monotonia psicológica da "mesmice" do treinamento diário, sem uma periodização de treino, pode ter impacto sobre o desempenho fisiológico e pode induzir o OTS. Já para Essig e Nosek (Essig e Nosek, 1997) e Tiidus e colaboradores (Tiidus, 1998) o estresse oxidativo pode ser a causa da instalação de FOR e NFOR. Esta hipótese baseia-se na alta capacidade oxidante das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS) em danificar estruturas intracelulares, inativando lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Radak *et al.*, 1999).

No início do século XXI, Smith (Smith, 2000) propôs que o trauma muscular esquelético é, frequentemente, o iniciador de OTS. Este tipo de "lesão" é referido como adaptativa a microtraumas (AMT) e pode ser considerada como uma fase inicial ao longo de um contínuo de lesões. O trauma subagudo induzido pelo exercício resulta na liberação de fatores inflamatórios locais que com a continuação do grande volume, alta intensidade de treino e descanso limitado, a inflamação aguda local torna-se crônica e as citocinas lançadas neste processo ativam monócitos circulantes, resultando em inflamação sistêmica.

Segundo Dong e colaboradores (Dong *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2013) o *overtraining* promove aumento de secreção de fatores inflamatórios que resulta em um desequilíbrio no sistema imunológico. Eles demonstraram que os neutrófilos de animais em *overtraining* apresentam a enzima NADPH oxidase na forma ativa proporcionando a produção de ROS, que podem causar estresse oxidativo, e apresentar uma capacidade

fagocítica reduzida. Demonstraram também que esse estresse excessivo está relacionado com o aumento de apoptose de neutrófilos e danos no DNA de linfócitos o que pode levar a um estado de imunossupressão.

2.2 O exercício físico e as alterações no sistema imunológico

Os benefícios da atividade física regular vêm se tornando um importante tópico de estudo na literatura atual. O exercício físico provoca uma miríade de benefícios para a saúde, aumentando, atuando de forma positiva nos sistemas imunológico e cardiovascular, corroborando com a diminuição e o controle de parâmetros inflamatórios e a prevenção e desenvolvimento de doenças, além de ser benéfico para o metabolismo (Luepker *et al.*, 1996; Haaland *et al.*, 2008; Newton e Galvao, 2008; Simpson *et al.*, 2012; Vina *et al.*, 2012). Para que todos esses benefícios ocorram, sessões de treino devem ser quantificadas com cautela respeitando a capacidade de cada indivíduo com seu nível de adaptação ao exercício, a que está sendo proposto, caso contrário sessões de alta intensidade e/ou volume podem acarretar lesões musculares, além de outros danos ao organismo (Armstrong, 1986; Ebbeling e Clarkson, 1989; Miles e Clarkson, 1994; Bigard, 2001; Byrne *et al.*, 2004).

O exercício excêntrico, tanto para indivíduos treinados quanto destreinados, pode causar danos significativos à musculatura esquelética (Armstrong *et al.*, 1983; Clarkson e Hubal, 2002; Mckune *et al.*, 2012). Desde o final do século 19 e início do século 20 foram realizados estudos em seres humanos investigando as respostas fisiológicas dessa modalidade de treino (Asmussen, 1953) que está relacionada à lesão muscular e ao termo *dor muscular de início tardio* (DMT) (Hough, 1902; Abraham, 1977; Armstrong *et al.*, 1991; Paulsen *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que a lesão causada na musculatura, pelo exercício excêntrico, desencadeia diferentes alterações no organismo, como aumento na produção de citocinas e leucócitos (Evans *et al.*, 1986; Paulsen *et al.*, 2012), aumento na liberação de enzimas proteolíticas por essas células (Salminen e Vihko, 1981; Belcastro, 1993; Warren *et al.*, 1999), rompimento estrutural da fibra muscular (Gibala *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2002) e aumento de creatina quinase no soro (Boppart *et al.*, 1999).

É bem descrito que o exercício excêntrico induz mudanças em muitos componentes do sistema imunológico. A lesão muscular esquelética induzida por esse exercício é seguida por uma resposta inflamatória, que é caracterizada pela infiltração de leucócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias pelo músculo esquelético, liberação sistêmica de mediadores inflamatórios na circulação, alterações na expressão de moléculas de adesão

nos leucócitos e modificação da atividade funcional dessas células (Arnaout, 1990; Peake *et al.*, 2005).

Neutrófilos e monócitos são as principais células recrutadas para o músculo danificado. Essas células contribuem diretamente para a lesão tecidual, pois liberam enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (NOS) que auxiliam na quebra de fragmentos do tecido muscular, amplificando a inflamação e contribuindo para o estresse oxidativo sistêmico associado ao dano muscular (Tidball, 2005). O exercício excêntrico também altera as concentrações de proteínas pró-apoptóticas nos leucócitos, resultando em aumento de apoptose em linfócitos e neutrófilos do sangue periférico, favorecendo o processo de imunossupressão (Park *et al.*, 2011).

Para reparar os danos causados pelo exercício o músculo produz e libera citocinas, interagindo assim com o sistema imunológico na regulação do processo inflamatório desencadeado pelo exercício (Febbraio *et al.*, 2002). As citocinas possuem um papel importante na resposta inflamatória do músculo e subsequente regeneração (Camus *et al.*, 1994). Uma das mais importantes vias de sinalização ativada durante o exercício excêntrico é a via do Fator de Ativação Nuclear (NF- κ B) (Garcia-Lopez *et al.*, 2007; Jimenez-Jimenez *et al.*, 2008). Essa via está relacionada com a síntese de várias citocinas produzidas em resposta ao exercício (Chiang *et al.*, 2009).

Baseado nos efeitos fisiológicos, as citocinas podem ser classificadas em pró ou anti-inflamatórias (Hirose *et al.*, 2004). A interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) são citocinas pró-inflamatórias detectadas no músculo esquelético cinco dias após o exercício excêntrico (Fielding *et al.*, 1993; Hamada *et al.*, 2004). As concentrações da interleucina 10 (IL-10) e do receptor solúvel de IL-1 β , ambos anti-inflamatórios, também estão aumentados na circulação após o exercício (Petersen *et al.*, 2001). Já a interleucina 6 (IL-6) que pode atuar tanto como pró quanto anti-inflamatórias é a citocina encontrada em maior concentração no músculo esquelético após o exercício excêntrico (Hamada *et al.*, 2004).

A combinação do tempo de exercício com o trabalho excêntrico aumenta a produção de ROS e NOS, como também há um aumento de citocinas anti-inflamatórias que parece ser um mecanismo protetor aos efeitos gerados pelo exercício acentuado (Zembron-Lacny *et al.*, 2010). Dessa forma, parece haver uma interação entre o músculo e o sistema imunológico na inflamação e no reparo dos danos causados pelo exercício.

2.3 O exercício físico e as alterações nas vias de sinalização do mTOR e da insulina

O exercício físico promove uma alteração no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas pelo músculo esquelético. Esse processo é altamente regulado e diversas vias de sinalização têm participação no controle dessa regulação (Pasiakos, 2012). Recentemente, foi descoberto que a via de sinalização mTOR (serina/treonina quinase de mamíferos alvo de rapamicina) está diretamente envolvida na regulação do metabolismo de proteínas pelo músculo esquelético (Goodman *et al.*, 2010). Essa via de sinalização regula uma variedade de processos em nosso organismo como processos relacionados ao crescimento celular. Mais recentemente tem sido verificado que a mTOR possibilita uma ligação entre a resposta imune e o metabolismo (Powell *et al.*, 2012).

O exercício excêntrico promove um aumento da ativação dessa via de sinalização, pois permite que a mTOR associe-se com mais eficiência ao ribossomo, favorecendo o desencadeamento da sua sinalização (Jacobs, 2013). Estudos têm mostrado que a ativação da mTOR está relacionada com a hipertrofia muscular, pelo aumento da síntese proteica, enquanto a atrofia do músculo está associada com um decréscimo da ativação dessa via de sinalização (Baar e Esser, 1999; Bodine *et al.*, 2001; Hornberger *et al.*, 2001; Goodman *et al.*, 2010). Estudos têm mostrado que, durante ou imediatamente após um exercício de resistência como uma corrida, a síntese de proteínas é reduzida e isso é atribuído em parte a diminuição da sinalização via mTOR (Gautsch *et al.*, 1998). O contrário é visto quando é realizado uma única sessão de exercício onde a via mTOR é ativada e consequentemente a síntese proteica (Bolster *et al.*, 2003; Kubica *et al.*, 2005). Dessa forma, dependendo da intensidade e do tipo de exercício a via de sinalização do mTOR pode sofrer alterações que refletem no metabolismo muscular.

A via de sinalização da insulina, assim como a via da mTOR, também sofre alterações decorrentes ao exercício físico. Estudos com humanos mostram sessões de exercício excêntrico são capazes de promover resistência à insulina (Kirwan *et al.*, 1992), com um ponto máximo de resistência de 2 dias após o exercício, sendo que esse efeito é desencadeado de forma localizada e sistêmica e é acompanhado pelo decréscimo da proteína responsável pelo transporte de glicose, dependente de insulina, para o interior da célula, denominada de GLUT4 (Asp *et al.*, 1995; Asp *et al.*, 1996). Kirwan e colaboradores (Kirwan *et al.*, 1992) mostraram que após um exercício exaustivo de corrida indivíduos apresentaram um aumento na secreção da insulina pelas células pancreáticas e um decréscimo na captação de glicose pelos tecidos, sugerindo um desequilíbrio na atividade

desse hormônio. Eles especularam se esse efeito seria decorrente da destruição do músculo ocasionado pelo exercício excêntrico. Além disso, tem sido descrito que o metabolismo da glicose no músculo está alterado, pois a falha da captação de glicose impede a resíntese e armazenamento do glicogênio muscular (Costill *et al.*, 1988; Doyle *et al.*, 1993).

A sinalização da insulina é desencadeada pelo substrato do receptor de insulina (IRS-1) (Cheatham e Kahn, 1995) que quando fosforilado implica em ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (Ogihara *et al.*, 1997). Isso culmina com a translocação do GLUT-4 para a membrana, possibilitando a entrada de glicose na célula. Des Aguila e colaboradores (Del Aguila *et al.*, 2000) estudando essa sinalização, demonstraram que o estresse ocasionado pela destruição muscular, proveniente do exercício excêntrico, promove um decréscimo na sinalização IRS-1 e PI3-K, culminando na resistência à ação da insulina. Eles verificaram também uma correlação entre o aumento de TNF- α e a resistência à insulina.

Mais recentemente, pesquisas têm mostrado que tecidos como o músculo, o fígado e o tecido adiposo desenvolvem resistência à insulina quando expostos a inflamação (Del Aguila *et al.*, 2000; Tilg e Moschen, 2008; Fernandez-Veledo *et al.*, 2009). Além disso, é sabido que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β têm a capacidade de aumentar a resistência à insulina (Osborn *et al.*, 2008; Tilg e Moschen, 2008).

2.4 Exercício físico e estresse no retículo endoplasmático

É documentado que células eucarióticas possuem uma organela denominada retículo endoplasmático (RE), onde polipeptídeos são sintetizados a partir do RNA mensageiro (RNAm) e se tornam proteínas maduras após o processo de enovelamento composto pelo desdobramento, montagem, formação de pontes dissulfetos e glicosilação de proteínas (Da Luz *et al.*, 2011). Tem-se que o funcionamento ideal do RE é essencial para a sobrevivência celular. Dessa maneira, em situações nas quais o RE passa por situações de desordens, o mesmo é submetido a distúrbios na síntese proteica, aumentando a síntese de proteínas imaturas, conhecidas como proteínas *unfolded* (não dobradas) e *misfolded* (mal dobradas), por conseguinte uma resposta adaptativa conhecida como UPR (resposta à proteína não dobrada) é acionada (Da Luz *et al.*, 2011), assim desencadeando uma cascata de sinalização com o intuito de resgatar a homeostase basal do meio.

Recentemente, vários estudos têm investigado o estresse do RE no tecido muscular durante o exercício. A ativação da UPR foi observada no músculo esquelético de humanos após 200km de corrida e após quatro semanas de treinamento físico houve aumento da

UPR como uma adaptação ao estresse do RE. Dessa forma, a contração do músculo está diretamente envolvida na ativação da UPR. Assim, o treinamento físico pode induzir uma adaptação ao estresse do RE no músculo esquelético. Além disso, os efeitos terapêuticos do exercício e a indução das respostas biológicas são conhecidos por estarem estreitamente relacionadas com a intensidade do exercício (Kim *et al.*, 2014).

O denominado “estresse do retículo”, dessa forma, são distúrbios na sinalização da UPR, esse por sua vez que é definido como sendo um desequilíbrio entre a quantidade 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 PERK (quinase do retículo endoplasmático semelhante à proteína quinase do pâncreas), a IRE1 (enzima ativada por inositol 1), e o ATF6 (fator 6 ativador de transcrição). Essas três proteínas são mantidas inativas, pois estão conectadas a uma chaperona BiP (*binding protein*) 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 (Ozcan *et al.*, 2004; Stern *et al.*, 2005; Eizirik *et al.*, 2007; Da Luz *et al.*, 2011).

Dessa forma, quando a IRE1 é autofosforilada, a mesma tem a ativação de seu domínio endoribonuclease. Uma vez ativa, a enzima aciona uma região do RNAm do fator de transcrição XBP1 (*X Box Protein 1*), que 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 (*tumor necrosis fator receptor-associated fator 2*) ativando a ASK1 (*apoptosis signal regulating kinase 1*) e formando o complexo ternário IRE1-TRAF2-ASK1, que pode ativar a JNK (*c-jun-terminal kinase*). A JNK fosforila determinados membros da família de proteínas supressoras de apoptose *Bcl-2* que levam à apoptose dependente de BAX (*Bcl-2 associated x protein*) (Ron e Walter, 2007). Em relação à PERK, na UPR a mesma gera a inibição do aporte de proteínas no RE. Sua ativação procede na fosforilação de sua proteína alvo, o eIF2 α (fator de iniciação da tradução eucariótico 2 α) no resíduo serina 51. O eIF2 α associa-se ao RNA transportador (RNAt) e a uma molécula de trifosfato de guanossina (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 CHOP (*C/EBP-*

Homologous Protein) por meio de uma via promotora de vários genes relacionados a UPR, a ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*). 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). Junto a isso, 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 mesmo induz a ativação transcricional do gene XBP-1, que quando traduzido liga-se ao promotor de genes que compilam chaperonas e proteínas associadas à degradação proteica (ERAD) (Seo *et al.*, 2008). Sabe-se que esses mecanismos têm o escopo de proteger a morte das células, diminuindo a síntese em geral e aumentando a produção de chaperonas. Entretanto, se a UPR persistir, esses não são suficientes para a diminuição das proteínas mal formadas, resultando em apoptose, a qual se acredita que envolva diferentes mecanismos, como a ativação de caspases (caspases 4 e 12), cinases (JNK) e CHOP (Da Luz *et al.*, 2011).

Sabe-se que o NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) poder ser ativado na UPR, por meio da supressão de transcrição de I κ B (*Inhibitor of kappa B*), envolvidos por mecanismos da PERK, derivando na regulação de mediadores da inflamação como IL-6 (interleucina 6) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). Assim, acredita-se que o estresse do RE possa ativar a via inflamatória por meio da UPR, como também os mediadores inflamatórios (JNK e IKK) podem ter impacto negativo sobre a função do RE (Ferreira *et al.*, 2007). O estresse do RE também tem sido definido como uma via envolvida na patogênese de diversas doenças, como obesidade, *diabetes mellitus* e esteatose hepática não alcoólica. 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 contribuem para o estabelecimento da esteatose ou progressão da doença. O estresse no 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) (Ordóñez *et al.*, 2015).

Demonstrou-se que o estresse no RE contribui também para a lesão isquêmica do miocárdio. A disfunção do RE induzida pela isquemia pode iniciar a morte celular, como resultado do desequilíbrio na homeostase do cálcio e/ou o dobramento de proteínas (Murlasits *et al.*, 2007). Pode iniciar também a apoptose por meio do seu efeito sobre a mitocôndria, que envolve as proteínas da família pró-apoptóticas Bcl-2, que conduzem à

perda do potencial da membrana mitocondrial, assim como sensibiliza a mitocôndria para sinais pró-apoptóticos por meio da regulação positiva do fator de transcrição CHOP (Murlasits *et al.*, 2007). Ozcan e colaboradores (Ozcan *et al.*, 2004) demonstraram que em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, a fosforilação da PERK e IRE1 α nos tecidos hepáticos e adiposos, 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.

Por outro lado, o exercício físico demonstrou efeitos positivos no tratamento da esteatose hepática, com atenuação do estresse oxidativo hepático, assim como um efeito cardioprotetor na lesão isquêmica, apesar de não se ter observado alteração na expressão de proteínas relacionadas ao estresse no RE (Murlasits *et al.*, 2007; Ordonez *et al.*, 2015).

2. Objetivos

Mediante a literatura apresentada e a linha de pesquisa do laboratório, o presente projeto teve como objetivo central avaliar e comparar, em modelo animal, os efeitos de nosso protocolo de OT baseado em sessões de EE, com outros dois protocolos, de mesmo volume e intensidade, mas realizados em aclone e sem inclinação, no conteúdo e ativação das proteínas das vias inflamatória e de sinalização da insulina e verificar o estresse no retículo endoplasmático em ambos os protocolos.

Para atingir este objetivo, foi desenvolvida a seguinte abordagem experimental por meio de 9 objetivos específicos com seus respectivos métodos:

1. Desempenho físico por meio dos testes incremental, exaustivo, teste de força de preensão e teste do ratarod;
2. Massa corporal e ingestão alimentar de camundongos por meio de mensuração diária;
3. Conteúdo protéico das citocinas IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-15, TNF-alfa e SOCS3 em músculos esqueléticos de camundongos com diferentes predominâncias de fibras musculares glicolíticas (EDL: extensor longo dos dedos) e oxidativas (Sóleo) por meio de análise pela técnica de *Wester Blotting*;
4. Concentrações séricas de IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-15 e TNF- α no soro de camundongos por meio de Luminex;
5. Análise do dano tecidual em músculo esquelético de camundongos por meio de análise histológica;
6. Conteúdo protéico e ativação das proteínas relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático ATF6beta (*Activating Transcription Factor 6*), eIF2alfa (*alfa subunit of eukaryotic initiation factor 2*), IRE-1alfa (*inositol-requiring enzyme-1alfa*), chaperona BiP (*binding protein*), e PERK (*protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*) em músculos esqueléticos de camundongos com

diferentes predominâncias de fibras musculares glicolíticas (EDL: extensor longo dos dedos) e oxidativas (Sóleo) por meio de análise pela técnica de *Wester Blotting*;

7. Conteúdo protéico e ativação das proteínas da via de sinalização da insulina IRbeta (por meio de *Immunoblotting*), IRS-1 e Akt (por meio de *Wester Blotting*), e GLUT-4 (por meio de separação da fração de membrana e posterior análise de seu conteúdo por meio de *Wester Blotting*) em músculos esqueléticos de camundongos com diferentes predominâncias de fibras musculares glicolíticas (EDL: extensor longo dos dedos) e oxidativas (Sóleo);
8. Conteúdo protéico e ativação das proteínas inflamatórias fator nuclear kappa B ($\text{NF } \kappa \text{ B}$), IKKalfa/beta, SAPK/JNK em músculos esqueléticos de camundongos com diferentes predominâncias de fibras musculares glicolíticas (EDL: extensor longo dos dedos) e oxidativas (Sóleo) por meio de análise pela técnica de *Wester Blotting*;
9. Ativação e sensibilidade a insulina por meio dos testes de tolerância e glicose (GTT) e resistência a insulina (ITT).

3. Casuística e Métodos

3.1 Animais experimentais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 124 camundongos C57BL/6 com oito semanas de vida provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais, sob condições controladas de ciclo claro-escuro (12/12h), com livre acesso à água e ração convencional. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo campus de Ribeirão Preto (ID 14.1.873.53.0) e aderiram ao *American College of Sports Medicine's* nos padrões de cuidados com animais. Os camundongos foram divididos em 4 grupos: Controle (CT; n=24; sedentários), *Overtraining* em declive (OTR/down; n=24; submetidos ao protocolo de OT com corrida na descida), *Overtraining* em aclave (OTR/up; n=24; submetidos ao protocolo de OT com corrida na subida) e *Overtraining* se inclinação (OTR; n=24; submetidos ao protocolo de OT com corrida sem inclinação). Antes do início dos experimentos com os grupos detalhados acima, foi realizado um projeto piloto, com o objetivo de verificar a eficácia dos protocolos OTR/up e OTR em diminuir o desempenho físico dos animais (n=20).

3.2 Avaliação de parâmetros metabólicos

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

3.3 Avaliação do desempenho físico

Os animais foram adaptados ao exercício em esteira rolante durante 5 dias, correndo 10min/dia na velocidade de 3m/min com inclinação de 0%. Durante a mesma semana experimental, 4 horas após a adaptação, os animais foram adaptados aos teste de força de preensão e rotarod, sendo realizadas três tentativas para cada animal. Quarenta e oito horas após os camundongos foram avaliados. As avaliações foram compostas pelo teste do rotarod (Bueno Junior *et al.*, 2012), teste exaustivo (Pereira *et al.*, 2012; Pereira, B. C *et al.*, 2013), teste de força de preensão (Bueno Junior *et al.*, 2012) e teste de carga incremental (Pereira *et al.*, 2012; Pereira, B. C *et al.*, 2013). Os camundongos foram

avaliados antes do início, e ao final da quarta, oitava e décima semana de aplicação dos protocolos experimentais.

3.3.1 Teste do rotarod (**TRR**)

Após 48 horas das últimas sessões dos protocolos experimentais, o teste do rotarod foi realizado. Nesse teste, o aparelho foi programado para apresentar velocidade inicial de 1rpm e final de 40rpm que foi alcançada 300s após o início do movimento. A aceleração durante todo o teste foi constante. Foram realizadas três tentativas por animal, com intervalo de 10s, e o tempo (s) até a queda de cada animal foi registrada (Bueno Junior *et al.*, 2012). 4h após a realização do teste do rotarod, os roedores realizaram o teste de carga incremental, conforme descrito no item 3.2 da presente dissertação.

3.3.2 Teste exaustivo (**TE**)

Após 4 horas da realização do TRR, 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 1 minuto (Pereira *et al.*, 2012; Pereira, B. C *et al.*, 2013).

3.3.3 Teste de força de preensão (**TFP**)

Após 24h da realização do TE, os camundongos realizaram o teste de força de preensão com a grade não inclinada. Foram realizadas três tentativas de preensão com as patas traseiras sem que os valores fossem considerados. Cada tentativa consistiu em tensionar o animal pela cauda, de modo que as patas passassem por todos os arames da grade e o roedor se desprende-se da mesma. Posteriormente, foram realizadas tentativas válidas e os três maiores valores de tensão aplicados foram registrados em *Newton* (N) (Bueno Junior *et al.*, 2012).

3.3.4 Teste incremental (**TI**)

Após 4h da realização do TFP Conforme padronizado por Ferreira *et. al* (Ferreira *et al.*, 2007), o teste de carga incremental foi iniciado na velocidade de 6m/min, com inclinação referente ao grupo específico e o período experimental, e incrementos de 3m/min a cada 3min até a exaustão voluntária dos camundongos, que ocorreu quando os mesmos encostavam 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min. A potência máxima (Pmax),

definida como a velocidade (m/min) de exaustão do animal, foi utilizada para a prescrição de intensidade no protocolo de OTR/down, OTR/up e OTR.

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

O OTR/down foi realizado conforme proposto por Pereira et al. (Pereira *et al.*, 2012), e foi composto por 10 semanas divididas em 6 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de RT. Após 8 semanas dos protocolos de OT os animais passaram por duas semanas de repouso total (RT) para verificação da eficácia dos protocolos e caracterização do estado de *overreaching* não funcional (Meeusen *et al.*, 2006). A tabela 1 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo do OTR/down.

Tabela 1. Protocolo de *overtraining* em declive.

Semana	Fase do treinamento	Intensidade (%Pmax)	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação (%)	Intervalo entre as Sessões (h)
1	F1	60	15	1	0	24
2	F1	60	30	1	0	24
3	F1	60	45	1	0	24
4	F1	60	60	1	0	24
5	F2	60	60	1	-14	24
6	F3	60	75	1	-14	24
7	F4	75	75	1	-14	24
8	F5	75	75	2	-14	4
9	F6	RT	RT	RT	RT	RT
10	F6	RT	RT	RT	RT	RT

RT: *Repouso total.*

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

O OTR/up foi realizado conforme proposto por Pereira et al. (Pereira *et al.*, 2012), e foi composto por 10 semanas divididas em 6 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de RT. Após 8 semanas dos protocolos de OT os animais passaram por duas semanas de repouso total (RT) para verificação da eficácia dos protocolos e caracterização do estado de *overreaching* não funcional (Meeusen *et al.*, 2006). A tabela 1 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo do OTR/up.

Tabela 2. Protocolo de *overtraining* em aclave.

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	60	75	1	+14	24
7	F4	75	75	1	+14	24
8	F5	75	75	2	+14	4
9	F6	RT	RT	RT	RT	RT
10	F7	RT	RT	RT	RT	RT

RT: *Repouso total.*

3.6 Protocolo de *overtraining* sem inclinação (OTR)

O OTR foi realizado conforme proposto por Pereira et al. (Pereira *et al.*, 2012), e foi composto por 10 semanas divididas em 6 fases. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de RT. Após 8 semanas dos protocolos de OT os animais passaram por duas semanas de repouso total (RT) para verificação da eficácia dos protocolos e caracterização do estado de *overreaching* não funcional (Meeusen *et al.*, 2006). A tabela 1 apresenta as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo do OTR.

Tabela 3. Protocolo de *overtraining* sem inclinação.

Semana	Fase do treinamento	Intensidade (%Pmax)	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação (%)	Intervalo entre as Sessões (h)
1	F1	60	15	1	0	24
2	F1	60	30	1	0	24
3	F1	60	45	1	0	24
4	F1	60	60	1	0	24
5	F2	60	60	1	0	24
6	F3	60	75	1	0	24
7	F4	75	75	1	0	24
8	F5	75	75	2	0	4
9	F6	RT	RT	RT	RT	RT
10	F7	RT	RT	RT	RT	RT

RT: Repouso total.

3.7 Abordagem experimental

A figura 1 apresenta a abordagem experimental durante as 11 semanas de trabalho.

Figura 1. Abordagem experimental. Repouso total após as oito semanas do protocolo de *overtraining* (RT).

3.7 Avaliação da tolerância intraperitoneal à insulina (ITT)

Após 24h da última sessão de treinamento físico da 8ª semana, os animais dos grupos CT, OTR/down, OTR/up e OTR foram submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina. 6h antes do início do referido procedimento experimental, os animais permaneceram sobre abstinência de alimento, mas com acesso livre à água.

Por meio de corte na extremidade da cauda do animal, foi realizada uma primeira coleta de sangue para a dosagem de glicose o que equivale ao tempo zero do teste. Após isso, 1.5 U/kg de insulina por kg de massa corporal (Humulin R) proveniente da *Eli Lilly* (*Indianapolis, IN, USA*) foram injetadas de forma intraperitoneal e amostras de sangue foram coletadas através da extremidade da cauda dos animais nos tempos 5, 10, 15, 20, 25

e 30min para a determinação da glicose (Jeukendrup, 2003). A concentração de glicose foi determinada através da utilização de glicosímetro (*Advantage, Boehringer Mannheim, USA*).

3.8 Avaliação da tolerância intraperitoneal à glicose (GTT)

Após 24h da última sessão de treinamento físico da 8ª semana, os animais dos grupos CT, OTR/down, OTR/up e OTR foram submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à glicose. 6h antes do início do referido procedimento experimental, os animais permaneceram sobre abstinência de alimento, mas com acesso livre à água.

Por meio de corte na extremidade da cauda do animal, foi realizada uma primeira coleta de sangue para a dosagem de glicose o que equivale ao tempo zero do teste. Após isso, 0,6 uL de glicose 50% por kg de massa corporal proveniente da *Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA)* foram injetadas de forma intraperitoneal e amostras de sangue foram coletadas através da extremidade da cauda dos animais nos tempos 15, 30, 45, 60, e 120min para a determinação da glicose (Jeukendrup, 2003). A concentração de glicose foi determinada através da utilização de glicosímetro (*Advantage, Boehringer Mannheim, USA*).

3.9 Extração do músculo esquelético e coleta de sangue

Após 36 horas do teste de incremental, ao final da oitava semana e posteriormente ao final da décima semana de aplicação dos protocolos experimentais, e em jejum de aproximadamente 12h, os animais dos grupos CT, OTR/down, OTR/up e OTR foram anestesiados através da administração intraperitoneal de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (100 mg/kg) misturadas na mesma seringa. O controle da anestesia foi avaliado pela perda dos reflexos pedal e corneano (Pauli *et al.*, 2008). Posteriormente os músculos extensor digitorum longus (EDL) e o sóleo de ambos os membros posteriores foram removidos 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 30 segundos. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000rpm durante 30min. No sobrenadante, foi determinada a concentração de proteínas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). Os animais, que foram direcionados a serem avaliados quanto a via de sinalização da insulina, tiveram primeiramente os

músculos EDL e Sóleo da pata traseira direita retirada e utilizados como controle negativo. Logo após a cavidade abdominal foi aberta e a veia porta hepática foi localizada, posteriormente 0,1mL de insulina (5-3mol/L) foram injetados. Fato esse necessário para que ocorra a ativação da via de sinalização da insulina por meio de ativação do receptor de insulina (IR). Depois de 45s, devido à diferença entre a porcentagem de fibras glicolíticas e oxidativas e o tempo necessário para que a insulina atingisse a musculatura a pata traseira esquerda foi retirada e utilizada como controle positivo, a seguir o processo de preparo das amostras aconteceu como dito anteriormente.

3.9.1 Coleta de sangue total periférico e avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias

Após 3min do início da coleta tecidual as amostras de sangue foram coletadas por decapitação do animal. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.500 rpm por 15min e o soro foi armazenado em freezer a -80oC para posterior determinação das concentrações das citocinas por meio dos reagentes do método Luminex™ multiplex segundo as instruções do fabricante (Millipore, ST Charles, MO).

3.10 Determinação do conteúdo de GLUT-4 na membrana plasmática

Após a coleta tecidual, ao final da oitava semana, para a determinação do conteúdo de GLUT-4 na membrana plasmática, amostras de EDL e Sóleo foram homogeneizados em tampão de STE (0,32M sucrose, 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 2mM EDTA, 1mM DTT, 100mM fluoreto de sódio, 100mM pirofosfato de sódio, 10mM ortovanadato de sódio, 1mM PMSF e 0,1mg aprotinina/ml a 4°C. As amostras foram centrifugadas ($1.000 \times g$, 25 min, 4°C) para obtenção dos *pellets*. Os *pellets* foram lavados com tampão de STE, novamente centrifugados ($1.000 \times g$, 10 min, 4°C) e ressuspensos em tampão contendo Triton (1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 200mM EDTA, 10mM ortovanadato de sódio, 1mM PMSF, 100mM NaF, 100mM pirofosfato de sódio e 0,1mg aprotinina/ml), mantidos no gelo por 30 min e centrifugados ($15.000 \times g$, 30 min, 4°C) para a obtenção da fração nuclear. O sobrenadante foi centrifugado a ($100.000 \times g$, 60 min, 4°C) para a obtenção da fração citosólica e o *pellet*, ressuspense em tampão de STE 1% NP-40, mantidos no gelo por 20 min e centrifugado a ($100.000 \times g$, 20 min) para a obtenção da fração membrana. Vale salientar que cada animal teve primeiramente a os músculos EDL e Sóleo da pata direita retirada e utilizado como controle negativo e posteriormente à ativação da via de sinalização da insulina, como descrito anteriormente a

pata trazeira esquerda foi retirada e utilizada como controle positivo. Posteriormente, a determinação do conteúdo protéico foi realizada pela técnica de *immunoblotting* descrita a seguir.

3.11 Técnica de immunoblotting

As proteínas foram desnaturadas por fervura em tampão de amostra de Laemmli contendo DTT 100mM, realizado em gel SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, Hybond ECL, RPN303D). A eficiência da transferência para membranas de nitrocelulose foi verificada por coloração breve das bandas com Ponceau. Estas membranas foram então bloqueadas com solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo 5% de BSA e 0,1% de Tween-20, durante 1 hora, a 4° C. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos específicos (anti-IR, *phospho*-IR, anti-IRS-1, *phospho*-IRS-1, anti-Akt, *phospho*-Akt, anti-GLUT-4, anti-NFκB, *phospho*-NFκB, anti-SAPK/JNK, *phospho*-SAPK/JNK, anti- IKKalfa/beta, *phospho*-IKKalfa/beta, anti-SOCS3, anti-IL-1beta, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-15, anti-TNFalfa, anti-ATF6beta, anti-eIF2alfa, *phospho*-eIF2alfa, anti-IRE-1alfa, *phospho*-IRE- 1alfa, anti-PERK, *phospho*-PERK, anti-BiP e anti-beta-actina .

Foram realizadas 5 lavagens de 5 min com TBS contendo 0,1% de tween-20, 16 horas após a incubação com os específicos anticorpos primários, 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 por ChemiDoc XRS Imaging System (BioRad) e quantificados utilizando software Image Lab 3.0. Os anticorpos foram provenientes das empresas *Cell Signalling Technology* (*Cell Signalling Technology, MA, USA*), *Santa Cruz Biotechnology* (*Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA*) e *Upstate Biotechnology* (*Upstate Biotechnology, NY, USA*), de acordo com a disponibilidade. Os reagentes químicos de rotina foram provenientes da *Sigma Chemical Corporation* (*St. Louis, MO, USA*).

3.12 Análise Histológica

Foram obtidos amostras de músculo EDL e Sóleo a partir do final da semana 8. Logo após a coleta, o material foi fixado em formol tamponado a 4% por até 48 horas. Após fixação, os tecidos foram processados, incluídos em parafina e secções longitudinais foram obtidas a partir de cada amostra de músculo esquelético (10 um de espessura) e

foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação morfológica. Os cortes histológicos foram fotograficamente digitalizado (aumento de 40x) com uma câmera digital (Axiocam-HR, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) montado em um microscópio de luz (AxioCam 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

3.13 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. A análise de variância foi utilizada para verificar os efeitos dos protocolos experimentais nos parâmetros estudados. Quando a análise de variância indicou significância, o teste *post hoc* de Bonferroni foi utilizado. Foi adotado o nível de significância $p \leq 0.05$.

4. Resultados

4.1 Avaliação dos parâmetros de desempenho dos animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais:

As alterações de percentual (%) de velocidade de exaustão, tempo de exaustão e rotarod das semanas 0 à 8 para OTR/down, OTR/up e OTR foram mais baixos quando comparado ao grupo controle (CT) (figura 2A, 2B e 2C). Além disso, figura 2C mostra que o desempenho no teste do rotarod do OTR foi melhor quando comparado com OTR/down. De acordo com a figura 2D o teste de força de preensão do OTR/down foi menor comparado ao CT, OTR/up e OTR quanto à variação das semanas 0 à 8. Considerando o mesmo período, o teste de força de preensão do OTR/up e OTR foi menor quando comparado ao CT.

Da semana 8 a semana 10, enquanto a velocidade de exaustão do OTR/down estava menor comparada ao CT (figura 2A), o tempo de exaustão para o OTR estava maior comparado ao CT (figura 2B). Além disso, a figura 2C mostra que o rotarod para OTR/down, OTR/up e OTR é menor comparado ao CT. Considerando o mesmo período, enquanto o OTR/up apresentou menor desempenho no teste de força de preensão comparado com o OTR, o mesmo apresentou maior desempenho comparado com o CT (figura 2D).

Figura 2. Avaliação do percentual de alterações nos testes de desempenho dos animais submetidos aos diferentes protocolos de *overtraining*. Velocidade de exaustão (A), tempo de exaustão (B), teste do rotarod (C) e teste de força de preensão (D) para as semanas experimentais de 0 à 8 e 8 à 10 para os grupos experimentais. Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 ($n = 12$). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise estatística:** * $P < 0.05$ vs. CT; † $P < 0.05$ vs. OTR/down; $\phi P < 0.05$ vs. OTR; ** $P < 0.05$ vs todos os grupos experimentais no mesmo período.

4.2 Análise dos parâmetros metabólicos de animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais:

As figuras 3A e 3C demonstram, respectivamente, os valores de massa corporal e ingestão alimentar para os grupos CT, OTR/down, OTR/up e OTR durante as semanas experimentais. É possível observar, na figura 3B, que o grupo OTR/down teve decréscimo de percentual de alteração de massa corporal comparado com os grupos CT, OTR/up e OTR. Sendo essa variação entre as semanas 0 e 8. No entanto, quando observado entre as semanas 8 e 10 (Repouso total), OTR/down teve aumento significativo de percentual de alteração de massa corporal comparado com o grupo CT. Em relação à ingestão alimentar, é possível observar na figura 3D que OTR/up teve aumento significativo de percentual de alteração entre as semanas 0 e 8 quando comparado com os outros grupos. Quando observado o percentual de alteração de massa corporal entre as semanas 8 e 10, o grupo OTR/down teve aumento significativo de percentual de alteração de peso corporal comparado com o grupo CT.

As figuras 3E e 3F representam a área sobre a curva (AUC) para os teste de GTT e ITT ($\text{mg.dL}^{-1} \times \text{min}$), respectivamente. Todos os grupos tiveram menores valores de área sobre a curva estatisticamente significativos quando comparado ao grupo CT (Figura 3E).

Figura 3. Análise dos parâmetros metabólicos dos animais submetidos aos diferentes protocolos de *overtraining*: Análise do peso corporal(g) e ingestão alimentar (g) durante as semanas experimentais para todos os grupos (A e C). Porcentagem de alteração de peso corporal (B) e ingestão alimentar (D) entre as semanas 0 - 8 e 8 - 10. Área sobre a curva (AUC; mg.dL⁻¹ x min) para as respostas de glicose sanguínea durante 120min após injeção intraperitoneal de glicose ao final da semana 8 (2g.kg⁻¹) (E). Área sobre a curva (AUC; mg.dL⁻¹ x min) para as respostas de glicose sanguínea durante 30min após injeção intraperitoneal de insulina ao final da semana 8 (1.5 U.kg⁻¹) (F). Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 (n = 12). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise estatística:** *P < 0.05 vs. CT; **P < 0.05 vs todos os grupos experimentais no mesmo período.

4.3 Avaliação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e de SOCS3 no músculo EDL de animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais:

As figuras 4A e 4F mostram que, ao final 8ª semana dos protocolos de OT, os níveis da citocina IL-1 β e do SOCS3 no grupo OTR/down foram maiores quando comparados com os grupos CT, OTR/up e OTR. Além disso, IL-1 β , IL-6, TNF- α e SOCS3 no OTR obtiveram maiores níveis quando comparado com o CT (figura 4A, 4B, 4E e 4F). Enquanto os níveis de IL-6 no OTR/down foram maiores quando comparado ao CT, os níveis de IL-6 no grupo OTR/up estavam menores quando comparado ao OTR/down (figura 4B). A figura 4E mostra que os níveis de TNF- α no OTR/down foram maiores quando comparado ao CT, mas o mesmo parâmetro no OTR/up foi menor quando comparado aos grupos CT, OTR/down e OTR. Os níveis de SOCS3 no grupo OTR/up foram menores quando comparados ao OTR/down e OTR (figura 4F). Os níveis de IL-10 e IL-15 não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (figura 4C e 4D).

A figura 4A mostra que na semana 10, os níveis de IL-1 β no grupo OTR foram menores quando comparado aos grupos OTR/down e OTR/up. Enquanto os níveis de IL-6 no OTR/up e OTR foram menores quando comparado ao CT, os níveis de IL-10 nos grupos OTR/up e OTR foram maiores quando comparados ao grupo CT (figura 4B e 4C). Comparado com todos os grupos experimentais, os níveis de IL-10 no grupo OTR/down apresentaram valores mais elevados (figura 4C) e os níveis de IL-15 valores mais elevados de todos os grupos de *overtraining* comparados ao grupo CT (figura 4D). TNF- α e SOCS3 não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (figura 4E e 4F).

Figura 4. Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e de SOC3 no músculo EDL dos animais submetidos ao diferentes protocolos de *overtraining*: Níveis protéicos de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-15 (D), TNF- α (E) e SOCS3 (F), e seus respectivos controles (beta-actina) no músculo EDL para todos os grupos experimentais no final das semanas 8 e 10 (unidades arbitrárias). Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 ($n = 12$). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise estatística:** * $P < 0.05$ vs. CT; † $P < 0.05$ vs. OTR/down; Φ $P < 0.05$ vs. OTR/down e OTR/up; λ $P < 0.05$ vs. OTR/down e OTR; ** $P < 0.05$ vs. todos os grupos experimentais no mesmo período.

4.4 Avaliação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e de SOCS3 no músculo Sóleo de animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais:

As figuras 5A, 5B e 5F mostram que, ao final da 8ª semana dos protocolos de OT, os níveis de IL-1 β , IL-6 e SOCS3 no grupo OTR/down foram maiores comparado aos grupos CT, OTR/up e OTR. Os níveis de IL-6 no OTR/up e os níveis de TNF- α nos grupos OTR/up e OTR foram maiores comparados ao CT (figura 5B e 5E). Além disso, é possível observar na figura 5B que os níveis de IL-6 no OTR foram menores comparados aos grupos OTR/down e OTR/up, enquanto que a figura 5E mostra que os níveis de TNF- α no OTR/down foram maiores quando comparado ao CT. Os níveis de IL-10 e IL-15 não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (figura 5C e 5D).

Ao final da semana 10, comparado com todos os grupos experimentais, os níveis de IL-10 no CT apresentaram menores valores, enquanto o OTR/down apresentou níveis mais elevados que todos os grupos experimentais. Além disso, IL-10 no OTR/up foi menor comparado ao OTR (figura 5C). Analisando a figura 5D é possível observar que os níveis de IL-15 no OTR/up foram maiores quando comparados aos grupos CT e OTR. Os níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α e SOCS3 não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (figura 5A, 5B, 5E e 5F).

Figura 5. Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e de SOCS3 no músculo Sóleo dos animais submetidos ao diferentes protocolos de *overtraining*: Níveis protéicos de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-15 (D), TNF- α (E) e SOCS3 (F), e seus respectivos controles (beta-actina) no músculo EDL para todos os grupos experimentais no final das semanas 8 e 10 (unidades arbitrárias). Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 (n = 12). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise estatística:** *P < 0.05 vs. CT; †P < 0.05 vs. OTR/down; Φ P < 0.05 vs. OTR/down e OTR/up; λ P < 0.05 vs. OTR/down e OTR; δ P < 0.05 vs. OTR/up; **P < 0.05 vs. todos os grupos experimentais no mesmo período.

4.5 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro de animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais:

Ao final da 8ª semana dos protocolos de OT, os níveis de IL-1 β e IL-6 nos grupos OTR/down, OTR/up e OTR foram maiores quando comparados ao grupo CT (figura 6A e 6B). Além disso, a figura 6A mostra que os níveis de IL-1 β no OTR foram menores quando comparado ao OTR/down. Em relação aos níveis de IL-15, o grupo OTR/up obteve maiores valores quando comparado ao CT, enquanto que para o OTR os níveis foram maiores comparado com os grupos CT, OTR/up e OTR/down (figura 6D). A figura 6E mostra que os níveis de TNF- α no OTR/down e OTR/up foram maiores quando comparado com os grupos CT e OTR. IL-10 não apresentou diferença entre os grupos experimentais (figura 6C). Já no final da semana 10, os níveis de IL-1 β nos grupos OTR/down e OTR foram menores quando comparado com o grupo CT. Além disso, os níveis de IL-1 β no OTR/up foram menores quando comparado com os grupos CT, OTR/down e OTR (figura 6A). Os níveis de IL-15 no grupo OTR foram menores quando comparado com o grupo CT (figura 6D). Além disso, as figuras 6B, 6C e 6E mostram que os níveis de IL-6, IL-10 e TNF- α não tiveram diferença entre os grupos experimentais.

Figura 6. Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro dos animais submetidos aos diferentes protocolos de *overtraining*: Níveis protéicos no soro (pg/mL) de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-15 (D) e TNF- α (E) mensurados no final das semanas 8 e 10 para todos os grupos experimentais. Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 (n = 12). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise estatística:** * P < 0.05 vs. CT; Φ P < 0.05 vs. OTR/down; λ P < 0.05 vs. OTR/down e OTR/up; ** P < 0.05 vs. todos os grupos experimentais no mesmo período.

4.6 Análise histológica dos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos ao diferentes procedimentos experimentais:

Ao final da 8ª semana dos protocolos de OT, marcações de hematoxilina em amostras de músculo mostraram que seções longitudinais do músculo EDL e do músculo Sóleo do grupo CT apresentaram fibras de aparência normal (figura 7A e 7E). Seções longitudinais do EDL no OTR/down e OTR e seções longitudinais do sóleo no OTR/down, OTR/up e OTR apresentaram micro lesões com infiltrações polimorfonucleares (figura 7B, 7D, 7F, 7G e 7H). As figuras 7B e 7C mostram que seções longitudinais do EDL nos grupos OTR/down e OTR/up apresentaram infiltrações de macrófagos e neutrófilos. Seções longitudinais do EDL no grupo OTR e seções longitudinais do sóleo nos grupos OTR/down, OTR/up e OTR mostraram infiltração de macrófagos (figura 7D, 7F, 7G e 7H). Por fim, a figura 7G mostra que o músculo sóleo no grupo OTR/up apresentaram leucócitos picnóticos.

Figure 7. Análise histológica dos músculos EDL e sóleo dos animais submetidos aos diferentes protocolos de *overtraining*: análise de sessões longitudinais dos músculos EDL e Sóleo para os grupos CT (Figura A e E), OTR/down (Figura B e F), OTR/up (Figura C e G) e OTR (Figura D e H) no final da semana 8. Número de camundongos igual a 8 (n = 8). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Legenda:** * Micro-lesões com infiltrado polimorfonuclear. ➤ Leucócitos picnóticos. → Neutrófilos. —▷ Linfócitos. ▷ Macrófagos.

4.7 Avaliação do estresse no retículo endoplasmático de músculo EDL de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais:

No final da 8ª semana dos protocolos de OT, os níveis protéicos de BiP, ATF-6, pIRE1 (Ser734) e peIF2alpha (Ser52) no grupo OTR/down aumentaram quando comparado aos grupos CT, OTR /up e OTR (Figura 8A, 8B, 8C e 8E). A Figura 8A mostra que o OTR / up diminuiu os níveis protéicos de BiP em comparação com CT. OTR / down e OTR / up aumentaram os níveis de pPERK (Thr981) em comparação com CT (Figura 8D). Depois de duas semanas de recuperação, a figura 8A mostra que OTR / down e OTR / up aumentaram os níveis de BiP em comparação com CT. Por outro lado, OTR diminuiu os níveis de BiP em comparação com todos os grupos. A Figura 8B mostra que OTR teve diminuição dos níveis de ATF-6 quando comparado aos grupos CT, OTR /down e OTR / up. OTR / down teve aumento dos níveis pIRE1 (Ser734) e pPERK (Thr981) em comparação com todos os grupos (Figura 8C e 8D). Em relação aos níveis de peIF2alpha (Ser52) OTR /down e OTR /up tiveram aumento em seus níveis em comparação com todos os grupos (Figura 8E).

Figura 8. Avaliação da sinalização de estresse no retículo endoplasmático do músculo EDL dos animais submetidos aos diferentes protocolos de *overtraining*: Níveis protéicos de BiP (A), ATF-6 (B), pIRE1 (Ser734)/IRE1 (C), pPERK (Thr981)/PERK (D), pelfF2alpha (Ser52)/eIF2alpha (E), e seus respectivos controles (beta-actina) no músculo EDL para todos os grupos experimentais no final das semanas 8 e 10 (unidades arbitrárias). Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 ($n = 12$). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise Estatística:** * $P < 0.05$ vs. CT; ** $P < 0.05$ vs. todos os grupos experimentais no mesmo período.

4.8 Avaliação do estresse no retículo endoplasmático de músculo Sóleo de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais:

No final da 8ª semana dos protocolos de OT, enquanto o OTR / up aumentou os níveis protéicos de BiP em comparação com CT e OTR / down, OTR aumentou os níveis protéicos desta proteína em comparação com todos os grupos (Figura 9A). A Figura 9B mostra que OTR / down diminuiu os níveis protéicos de ATF-6 em relação a todos os grupos. Além disso, OTR diminuiu os níveis protéicos dessa proteína em comparação com CT e OTR / up (Figura 9B). Enquanto OTR / down aumentou os níveis protéicos de pIRE1 (Ser734) em relação a todos os grupos, OTR / up aumentou os níveis protéicos dessa proteína em comparação com CT. Além disso, OTR diminuiu os níveis protéicos dessa proteína em comparação com OTR / up (Figura 9C). A figura 9D mostra que OTR / down, OTR / up e OTR aumentaram os níveis protéicos de pPERK (Thr981) em comparação com CT. Junto a isso, OTR / up teve esse aumento sendo menor que em OTR / down e OTR. Na figura 9E é possível observar que OTR / down, OTR / up e OTR aumentam os níveis de peIF2alpha (Ser52) em relação ao CT, e OTR / up esse aumento foi maior em comparação com OTR / down. Além disso, OTR teve aumento nos níveis de peIF2alpha (Ser52) em comparação com OTR / down e OTR / up.

Depois de duas semanas de período de recuperação total, OTR / down teve aumento nos níveis de BiP, pIRE1 (Ser734) e pPERK (Thr981) em relação a todos os grupos (Figura 9A, 9C e 9D). A Figura 9A mostra que OTR diminuiu os níveis protéicos de BiP em comparação com CT e OTR / up. OTR / down e OTR aumentaram os níveis protéicos de ATF 6 quando comparado aos grupos CT e OTR / up (Figura 9B). É possível observar na figura 9C que OTR teve diminuição nos níveis protéicos de pIRE1 (Ser734) em comparação com CT e OTR / up. OTR / up teve aumento nos níveis proteicos de pPERK (Thr981) em comparação aos grupos CT e OTR (Figura 9D). Enquanto OTR / down teve níveis protéicos aumentados de peIF2alpha (Ser52) quando comparado aos grupos CT e OTR, OTR / up aumentou os níveis desta proteína em comparação com todos os grupos (Figura 9E).

Figura 9. Avaliação da sinalização de estresse no retículo endoplasmático do músculo Sóleo dos animais submetidos aos diferentes procedimentos de *overtraining*: Níveis protéicos de BiP (A), ATF-6 (B), pIRE1 (Ser734)/IRE1 (C), pPERK (Thr981)/PERK (D), pelf2alpha (Ser52)/eIF2alpha (E), e seus respectivos controles (beta-actina) no músculo EDL para todos os grupos experimentais no final das semanas 8 e 10 (unidades arbitrárias). Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 ($n = 12$). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise Estatística:** * $P < 0.05$ vs. CT; ** $P < 0.05$ vs. todos os grupos experimentais no mesmo período.

4.9 Análise da via de sinalização da insulina nos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais:

No final da 8ª semana dos protocolos de OT, tanto para o músculo EDL como para o músculo sóleo, OTR/down, OTR/up e OTR tiveram diminuição nos níveis protéicos da razão pIRbeta(Thr1146)/ IRbeta, após injeção de insulina, quando comparado ao grupo CT. No entanto, OTR/down teve essa diminuição sendo significativa quando comparado aos grupos OTR/up e OTR (Figura 10A e 10B). Independente da estimulação por insulina, os níveis protéicos da razão pIRS-1(ser307) / IRS-1 sofreram aumento estatisticamente significativos para o grupo OTR/down quando comparado com todos os grupos tanto para o músculo EDL (Figura 10C) quanto para o músculo sóleo (Figura 10D).

Quando observado os níveis protéicos da razão pAKT(Ser473)/AKT com e sem ativação por insulina, OTR/down teve menores valores quando comprado a todos os grupos, enquanto OTR/up teve níveis protéicos mais elevados comparado a todos os grupos, no músculo EDL (Figura 10E). No entanto, quando observado o músculo sóleo (Figura 10F) todos os grupos tiveram menores valores significativos comparados ao grupo CT.

As figuras 10G e 10H mostram os níveis protéicos de GLUT4 na fração de membrana dos músculos EDL e Sóleo, respectivamente. OTR/down teve diminuição significativa quando comparado ao grupo controle em ambos os tecidos. No entanto, OTR/up e OTR tiveram diminuição significativa quando comparado ao grupo, apenas no músculo Sóleo.

Figura 10. Análise da via de sinalização da insulina nos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes procedimentos de *overtraining*: Níveis protéicos da razão pIRbeta(Thr1146)/ IRbeta, após injeção de insulina nos músculos EDL e sóleo (A e B). Razão pIRS-1(ser307) / IRS-1, independente de insulina, nos músculos EDL e sóleo (C e D). Níveis protéicos da razão pAKT(Ser473)/AKT com e sem ativação por insulina nos músculos EDL e sóleo (E e F). GLUT4 na fração de membrana dos músculos EDL e Sóleo (G e H) e seus respectivos controles (beta-actina) para todos os grupos experimentais no final da semana 8 (unidades arbitrárias). Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 ($n = 12$). **Abreviaturas:** CT: camundongos sedentários. OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise Estatística:** * $P < 0.05$ vs. CT; $\lambda P < 0.05$ vs. OTR/down e OTR/up; ** $P < 0.05$ vs. todos os grupos experimentais no mesmo período.

4.10. Análise da sinalização inflamatória nos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes procedimentos experimentais:

Ao final da 8ª semana dos protocolos de OT, os níveis protéicos da razão de IKKalpha/beta (Ser180/181)/IKKbeta, do grupo OTR/down, aumentaram significativamente quando comparado a todos os grupos e em ambos os tecidos (11A e 11B). Quando observado os níveis protéicos da razão pSAPK-JNK (Thr183/Tyr185) / SAPK-JNK, em ambos os tecidos (Figuras 11C e 11D), OTR/down aumentaram significativamente quando comparado a todos os grupos. No entanto, para o músculo sóleo OTR causou diminuição significativa comparada a todos os grupos.

As figuras 11E e 11F mostram os níveis protéicos da razão pNF- κ B p65 (Ser536)/ NF- κ B p65 na fração nuclear dos músculos EDL e Sóleo, respectivamente. OTR/down aumentou significativamente os níveis protéicos quando comparado a todos os grupos e em ambos os tecidos.

Figura 11. Análise da sinalização inflamatória nos músculos EDL e Sóleo de animais submetidos aos diferentes protocolos de *overtraining*. Níveis protéicos da razão pIKKalpha/beta (Ser180/181)/IKKbeta nos músculos EDL e sóleo (A e B). Razão pSAPK-JNK(Thr183/Tyr185)/SAPK-JNK nos músculos EDL e sóleo (C e D). pNF-κβ p65 (Ser536)/NF-κβ p65 na fração nuclear dos músculos EDL e sóleo (E e F) e seus respectivos controles (beta-actina) para todos os grupos experimentais no final da semana 8 (unidades arbitrárias). Dados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão. Número de camundongos igual a 12 ($n = 12$). CT: camundongos sedentários. **Abreviaturas:** OTR/down: *overtraining* em corrida na descida. OTR/up: *overtraining* em corrida na subida. OTR: *overtraining* em corrida sem inclinação. **Análise Estatística:** * $P < 0.05$ vs. CT; ** $P < 0.05$ vs. todos os grupos experimentais no mesmo período.

5. Discussão

Os três protocolos de OT, corrida no declive (OTR/down), corrida no aclone (OTR/up) e corrida sem inclinação (OTR), levaram a um estado similar de *overreaching não funcional* (NFOR) e estão ligados a um estado pró-inflamatório. No entanto, OTR/down foi o único a estar ligado a um aumento da expressão das proteínas de estresse no Retículo Endoplasmático (RE) do músculo esquelético e prejuízo na transdução de sinal na via de sinalização da insulina muscular. Além disso, após 2 semanas de recuperação total, a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-15, parecem influenciar os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Contudo, no RE, a expressão de proteínas relacionadas com o estresse, não foi reduzida após 2 semanas do período de recuperação total, sugerindo uma possível condição patológica do estresse no RE em ambas amostras de músculo esquelético.

Oito semanas de protocolo de OT, com a mesma carga externa (intensidade x volume), mas realizados em declive, aclone e sem inclinação, levaram a queda similar da maioria dos parâmetros de desempenho, a qual reforça que o NFOR pode ser induzido sem a predominância de sessões de exercício excêntrico (EE) (Hohl *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2015). Carmichael e colaboradores (Carmichael *et al.*, 2005) verificaram que sessões agudas de corrida em declive (CD) e aclone (CA) realizadas a 22m/min durante 150 min levam a diferentes respostas no desempenho. De fato, a CD retardou a recuperação no desempenho de atividade física voluntária na roda para até 72h e diminuiu o tempo de exaustão mensurado 24h e 48h após uma sessão prévia de exercício. Essas diferenças foram relacionadas a níveis mais elevados de IL-6, IL-1 β e TNF- α no músculo sóleo (Davis *et al.*, 2007) e níveis elevados de IL-1 β no córtex e cerebelo (Carmichael *et al.*, 2005) do CD comparado com o CA.

De acordo com investigações na literatura (Carmichael *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2007), se supõe que o OTR/down demonstra maior queda de desempenho comparado ao OTR/up e OTR. De fato, OTR/down apresenta uma queda mais pronunciada no teste do rotarod comparado ao OTR. O desempenho do rotarod é influenciado pelo teste de resistência cardiorrespiratória, coordenação motora e aprendizado (Caston *et al.*, 1995). Uma vez que o teste de resistência cardiorrespiratória (exaustão x velocidade) não apresentou diferença entre o OTR/down e o OTR, acredita-se que a diferença entre os grupos no rotarod ocorreu por causa da coordenação motora e/ou aprendizado. Considerando que ambos os protocolos de OTR e rotarod foram realizados no plano horizontal, a aprendizagem pode ter influenciado os resultados melhores de OTR em comparação ao OTR/down.

Em relação ao teste de força de preensão, o OTR/down também apresentou um declínio mais pronunciado comparado ao OTR/up e OTR. Este resultado pode ser relacionado com a inibição da hipertrofia muscular esquelética observada no OTR/down (dados não apresentados). Já a ausência de diferença após as 8 semanas consecutivas do protocolo de OT para velocidade de exaustão e tempo de exaustão, entre os treinamentos, está em conformidade com dados anteriores (Pereira *et al.*, 2015) e pode ser parcialmente explicado pelas intensidades de trabalho dos grupos experimentais que foram medidos em declive no OTR/down, aclone no OTR/up e sem inclinação no OTR. Assim, a principal diferença desse estudo para outros, comparando os efeitos da corrida aguda (Carmichael *et al.*, 2005; Carmichael *et al.*, 2006; Cornachione *et al.*, 2011) ou crônica (Cornachione *et al.*, 2011; Lollo *et al.*, 2013; Isner-Horobeti *et al.*, 2014) em declive e aclone, é que nós utilizamos intensidades relativas de carga de trabalho e não absolutas.

De maneira geral, o mais inovador nesse estudo é que os animais submetidos aos diferentes protocolos de OT não melhoraram seu desempenho após 2 semanas do período de recuperação total. Dado que a reparação do desempenho ocorre depois de, no máximo 14 dias de recuperação em estado de *overreaching funcional* (FOR), podemos considerar que esses protocolos de OT induziram ao *overreaching não funcional* (NFOR), que é definida como a diminuição ou estagnação no desempenho que pode ser restabelecida após semanas ou meses de recuperação e pode estar ligada a distúrbios psicológicos e hormonais (Meeusen *et al.*, 2006; Meeusen *et al.*, 2013). Embora essa falta na recuperação do desempenho tenha sido previamente observada no OTR/down (Pereira *et al.*, 2012), verificamos resultados semelhantes para OTR/up e OTR.

A diferença significativa de percentual de alterações no peso corporal entre os grupos CT e OTR/down confirmou dados anteriores (Pereira, B. C. *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015). Durante o período de descanso total, OTR/down aumentou a massa corporal quando comparado com o CT, mas não apresentou diferença significativa em relação à ingestão alimentar, assim sugerindo que a queda de peso relatada entre as semanas 0 a 8 foi causada pelo hipermetabolismo e proteólise sob cargas de trabalho persistentes (Hohl *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2015). É documentado que sessões de corrida na subida demandam maior consumo energético do que corridas na descida (Carmichael *et al.*, 2005; Cornachione *et al.*, 2011). Dessa maneira, isso pode explicar a maior ingestão alimentar do OTR/up quando comparado ao OTR/down entre as semanas 0 a 8. Durante o período de descanso total, OTR/up não apresentou alterações significantes em ingestão alimentar quando comparado aos outros grupos experimentais, reforçando assim o fato de que entre

as semanas 0 a 8 o aumento de ingestão alimentar se deu pelo fato de que sessões de corrida na subida demandam maior consumo energético (Carmichael *et al.*, 2005; Cornachione *et al.*, 2011). Diferentemente de Hohl e colaboradores (Hohl *et al.*, 2009), nosso protocolo de OT sem inclinação, não causou diminuição de peso corporal. No entanto, existem algumas diferenças entre os métodos como o modelo animal (Wistar rats vs. C57BL/6 mice), número total de sessões de exercício (85 unidades vs. 45 unidades) e o número de vezes que a massa corporal foi mensurada (seis vezes durante as 11 semanas do protocolo de OT vs. diariamente durante as 8 semanas do protocolo de OT), isso certamente dificulta uma comparação mais precisa. Interessantemente, entre as semanas 8 a 10, os animais submetidos ao OTR diminuíram a ingestão alimentar quando comparado ao grupo CT. Esse resultado está de acordo com Kaiyala e colaboradores (Kaiyala *et al.*, 2012), que descreveram que o gasto de energia diminuído de forma aguda causa diminuição na ingestão de alimentos.

É bem descrito na literatura que TNF- α é um potente anorexígeno e uma citocina pró-catabólica (Matthys, 1997; Laviano *et al.*, 2003). Romanatto e colaboradores demonstraram que uma única e elevada dose de TNF- α injetado intracerebro-ventricular (ICV) no hipotálamo de ratos tem a capacidade de reduzir a ingestão alimentar e favorecer o catabolismo desses animais. Estes efeitos estão associados com ativação da sinalização pró-inflamatória clássica (Romanatto *et al.*, 2007). Nossos dados mostraram que, além de ocorrer uma redução percentual na massa corporal e na ingestão alimentar entre as semanas 0 e 8, os animais submetidos ao OTR/down apresentaram altos níveis protéicos de TNF- α no final da semana 8, como também de IL-1 β , pSAPKJNK e SOCS3 tanto em músculo esquelético quanto em amostras de tecido hipotalâmico (dados não apresentados). No entanto, durante o período de descanso total entre as semanas 8 e 10, o grupo OTR/down aumentou seu percentual de massa corporal sem alterações significantes no percentual de ingestão alimentar.

Modelos fisiopatológicos de obesidade e diabetes mellitus tipo 1 em ratos, apresentam uma melhora nos testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT), pelo treinamento (Luciano *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006). Além disso, Luciano e colaboradores investigaram que ratos saudáveis também obtiveram diferenças significativas entre os grupos sedentários e treinados para GTT e ITT. Curiosamente, nossos protocolos de OT aumentaram a tolerância a glicose (GTT), comparado ao CT, mas não influenciaram o ITT. Recentemente, observamos que o OTR/down é capaz de induzir prejuízo no sinal de transdução da via de sinalização da insulina sem diferenças significativas para o ITT

(Pereira, B. C *et al.*, 2013). Acredita-se que outros tecidos, incluindo o fígado podem não apresentar a inibição desta via, possuindo um papel importante na manutenção da homeostase da glicose. Dessa maneira, nossos resultados (Pereira, B. C *et al.*, 2013) confirmam e corroboram com outras investigações que mostram melhora a tolerância à glicose em ratos incapazes de sintetizar glicogênio muscular (Pederson, Cope, *et al.*, 2005; Pederson, Schroeder, *et al.*, 2005).

O conteúdo protéico das citocinas IL-6 e TNF- α nos músculos EDL e Sóleo dos animais submetidos ao treinamento de corrida no declive confirmou dados anteriores do grupo de pesquisa (Pereira, B. C. *et al.*, 2013). Para ambos os tecidos muscular, OTR/down aumentou a expressão de IL-1 β e SOCS3. Além disso, análises histológicas revelaram injúrias teciduais com infiltração de células mielóides, mais especificamente neutrófilos e macrófagos, no EDL e macrófagos no Sóleo. Em concordância, Fielding e colaboradores (Fielding *et al.*, 1993) verificaram que o dano no músculo esquelético, induzido pelo EE, está associado com infiltração de neutrófilos e acumulação de IL-1 β . As micro-lesões podem induzir a “inflamação estéril” que é marcada pelo recrutamento de células imunes e a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Por sua vez, a inflamação estéril é caracterizada pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados à danos (DAMP), que são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), amplificando a cascata de lesão tecidual (Chen e Nunez, 2010). Os DAMPs são liberados pela lesão do tecido e são reconhecidos por receptores como os toll-like (TLR), culminando na ativação de caspases intracelulares e produção de IL-1 β . Esta citocina é responsável por ampliar o recrutamento celular e a produção de outros mediadores inflamatórios (Chen e Nunez, 2010).

Com respeito a SOCS3, demonstramos que o aumento após o protocolo OTR/down, contribui para o prejuízo na sinalização da insulina nos músculos EDL e Sóleo (Pereira, B. C *et al.*, 2013). Além disso, os níveis elevados no soro de IL-1 beta, IL-6 e TNF- α reforçam o baixo grau de inflamação crônica ligada ao OTR/down (Pereira, B. C. *et al.*, 2013). Embora a IL-6 tenha ambas as propriedades anti e pró-inflamatórias (Scheller *et al.*, 2011) e o aumento sistêmico após o exercício moderado (Fischer, 2006), esta resposta da citocina à sepse ou exercício físico regular é diferente no que diz respeito ao aumento de TNF- α (Pedersen e Febbraio, 2008), o que sustenta o estado inflamatório induzido no OTR/down.

Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias em resposta a corrida em declive estão bem descritas (Davis *et al.*, 2007; Pereira, B. C. *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Isanejad *et*

al., 2015). Contudo, demonstramos que o protocolo de corrida com a mesma carga externa, mas realizado sem inclinação, também aumenta a expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α e SOCS3 no músculo EDL e TNF- α no Sóleo. Ambas as amostras musculares apresentaram micro-injúrias com infiltração de células polimorfonucleares e macrófagos. Em relação ao EDL no OTR/down e OTR, consideramos que o aumento da modulação das citocinas mencionadas resulta do desequilíbrio entre a demanda do exercício e períodos inadequados de recuperação e não foi influenciada pela predominância do músculo no tipo de contração. As discrepâncias entre os resultados apresentados para os músculos EDL e Sóleo no OTR podem estar relacionadas com as possíveis diferenças de padrão de recrutamento muscular durante a corrida sem inclinação. Assim, estudos futuros devem ser realizados a fim de verificar a atividade eletromiográfica desses músculos durante o OTR.

Como observado no OTR/down, níveis séricos de IL-1 β e IL-6 também aumentaram após o OTR, reforçando o estado inflamatório induzido pelo protocolo específico de OT. Já a ausência de aumento de TNF- α no soro em resposta ao OTR pode estar relacionada ao aumento expressivo de IL-15. Marzetti e colaboradores (Marzetti *et al.*, 2009), verificaram que essas citocinas foram negativamente correlacionadas com o envelhecimento muscular do roedor. Comparado com outros protocolos de OT, OTR/up levou à menor modulação nas concentrações de citocinas intramusculares. De fato, somente o conteúdo de IL-6 e TNF- α no músculo Sóleo teve aumento na expressão após o protocolo de OT. Curiosamente, as amostras desse músculo também apresentaram micro-injúrias com infiltração de neutrófilos. Entretanto, mais investigações utilizando eletromiografia são necessárias para clarear as diferentes respostas no EDL e Sóleo durante a realização do protocolo de corrida em active (OTR/up).

Similar ao OTR/down, OTR/up aumentou os níveis no soro de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , o que demonstra que esse protocolo específico também leva a uma inflamação sistêmica. A elevação dos níveis no Sóleo de IL-6 e TNF- α e no soro de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , observados após OTR/up realçam o efeito negativo da relação entre exercícios de alta carga e recuperação inadequada, uma vez que estas citocinas normalmente não aumentam em resposta a adaptações positivas induzidas pelo treinamento (Gleeson *et al.*, 2011; Pereira, B. C. *et al.*, 2013). O alto nível de TNF- α no músculo Sóleo foi a única alteração intramuscular comum entre os protocolos de OT. Considerando que TNF- α induz hiperalgesia e o bloqueio reduz a disfunção na contração do músculo esquelético após EE (Piers *et al.*, 2011), essa citocina pode desempenhar um papel central nos atuais declínios de desempenho observados. Assim futuras investigações devem inibir TNF-alpha após os

protocolos de OT para testar nossa hipótese prévia. Além disso, infiltração de macrófagos também ocorreram no músculo Sóleo nos três protocolos de OT e talvez o aumento de TNF- α possa estar relacionada à promoção do reparo tecidual e recuperação da homeostase (Rigamonti *et al.*, 2014).

Além de alterações na velocidade de exaustão e no rotarod para os animais submetidos ao OTR/down, em todos os protocolos de OT, o período de recuperação total de duas semanas normalizou os parâmetros de desempenho em comparação com o CT. Estes resultados ocorreram concomitantemente com retorno aos níveis normais da produção de citocinas intramuscular e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro do OTR/down, OTR/up e OTR comparado ao CT. Além disso, após o período de recuperação, IL-10 e IL-15 aumentaram no EDL nos três protocolos de OT. No Sóleo, enquanto IL-10 aumentou para todos os protocolos de OT, IL-15 aumentou somente para OTR/up. É documentado que a IL-10 tem um papel anti-inflamatória (Rosa Neto *et al.*, 2009; Ropelle *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2011). Recentemente, Pistilli e Quinn (Pistilli e Quinn, 2013) propuseram que a IL-15 pode atuar como reguladora das propriedades oxidativas e fadiga no músculo esquelético *in vivo*. Assim, a IL-10 e a IL-15 podem estar relacionadas com retorno aos níveis normais tanto dos parâmetros de desempenho como também dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Em relação ao estresse no Retículo Endoplasmático, sabe-se que um aumento crônico das citocinas pró-inflamatórias induz a esse quadro (Zhang, 2008). Dessa forma, esses dados podem ser parcialmente explicados pelos altos níveis de IL-6 e TNF- α , que anteriormente foram verificados em ambas amostras do músculo esquelético após OTR/down (Pereira, B. C. *et al.*, 2013). Além disso, níveis elevados de pIRE1 (phosphorylated inositol requiring enzyme 1 α) provavelmente contribuíram para o aumento da JNK observados. Elegantemente, Wu e colaboradores (Wu *et al.* 2011) mostraram a ativação da RPD (resposta de proteína desdobrada) no músculo esquelético após uma única sessão exaustiva de corrida na esteira; entretanto, ratos treinados apresentaram menor ativação ou mesmo repressão de algumas proteínas em comparação com roedores não treinados depois de serem desafiados com igual distância na corrida em esteira. Esses autores concluíram que o treino moderado adapta a RPD e protege o músculo esquelético de futuros estresses ergométricos. De acordo, Kim e colaboradores (Kim *et al.*, 2014), 5 semanas com períodos de treinamento de alta intensidade diminui o estresse no RE e no músculo gastrocnêmico de roedores.

Conforme Rayavarapu e colaboradores (Rayavarapu *et al.*, 2012), estresse no RE induzido por exercício moderado é considerado um mecanismo adaptativo que se torna patológico em situações em que o estresse descontrolado conduz a uma interferência com a ativação inflamatória. Com base nas investigações anteriormente mencionadas (Wu e Al., 2011; Rayavarapu *et al.*, 2012; Pereira, B. C. *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014) sugere-se que no OTR/down, o estresse do RE induzido no músculo esquelético, representa uma condição patológica. Essa ideia é reforçada pelos altos níveis da maioria das proteínas relacionadas com o estresse no RE no OTR/down nas amostras de EDL e de Sóleo, mesmo após duas semanas do período de recuperação total.

Exceto a BiP e a pPERK após OTR/up, as outras proteínas relacionadas com o estresse no RE mensuradas do EDL na semana 8 não foram alteradas em resposta ao OTR/up e OTR. Isso pode ser justificado de duas maneiras: a primeira reforça as investigações mencionadas anteriormente (Wu e Al., 2011; Kim *et al.*, 2014) e sugere uma adaptação positiva da RPD no EDL após estes protocolos de OT. A segunda hipótese é a de que o padrão de recrutamento muscular, durante a corrida realizada em aclone e sem inclinação, pode ser diferente em comparação com a corrida em descida. Curiosamente, após o período de recuperação, OTR/up indicou níveis mais elevados de peIF2 α comparado ao CT, OTR/down e OTR no EDL. Mesmo uma pequena fosforilação dessa proteína em Ser51 reduz drasticamente a atividade do fator de iniciação eucariótica 2B (eIF2B) (Oldfield *et al.*, 1994), que participa ativamente na síntese de proteínas do músculo esquelético (Farrell *et al.*, 1999).

Em relação ao músculo Sóleo na semana 8, o OTR/up e o OTR apresentaram níveis elevados de BiP, pPERK e peIF2 α , o que indica ativação da RPD para lidar com as demandas de exercícios desses protocolos de OT. Mesmo após duas semanas do período de recuperação total, o OTR/up exibiu altos níveis de pPERK e peIF2 α , sugerindo uma possível condição patológica do estresse no RE na amostra de músculo esquelético (Rayavarapu *et al.*, 2012).

Existe um consenso na literatura sobre os efeitos positivos do exercício físico em relação a vários fatores, valendo salientar principalmente efeitos positivos do exercício sobre a ação da insulina em estados de resistência (Henriksen, 2002; Hawley e Lessard, 2008). Corroborando com esse fato, vários estudos têm demonstrado os mecanismos moleculares, que o exercício físico seja agudo ou crônico, relacionados com a melhora da via de sinalização da insulina muscular, em indivíduos de idade avançada ou indivíduos obesos (Ropelle *et al.*, 2006; Pauli *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2010; Pauli *et al.*, 2010;

Oliveira *et al.*, 2011; Ropelle *et al.*, 2013). Além disso, é importante destacar que o treinamento de resistência é capaz de melhorar a via de sinalização da insulina muscular mesmo sem um estado de resistência à insulina anteriormente instalada (Arias *et al.*, 2001; Luciano *et al.*, 2002; Chibalin *et al.*, 2009). Assim, tem-se que, durante e após o descanso de sessões de exercício físico intenso, o músculo esquelético é capaz de aumentar em até 20 vezes o seu fluxo sanguíneo (Andersen, 1985) e esse coordenado com o recrutamento capilar e translocação do GLUT4 para o sarcolema e túbulos T, são importantes para a captação e oxidação da glicose (Richter e Hargreaves, 2013). Contrário a esses benefícios, tem-se que o exercício físico quando realizado de maneira intensa, sendo agudo ou crônico, é capaz de aumentar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e ativar inúmeras vias de sinalização celular, incluindo a vias das MAP Kinases. Sabe-se que a MAPK, por sua vez, tem a capacidade de ativar a via do NF-κB (Kramer e Goodyear, 2007) e sua ativação crônica está diretamente ligada a várias condições patológicas, incluindo resistência à insulina e perda de massa muscular (Sriwijitkamol *et al.*, 2006).

A regulação da fosforilação em serina 307 do IRS-1 está diretamente relacionada ao mecanismo molecular responsável pela deficiência na via de sinalização de insulina (Hotamisligil *et al.*, 1996; Virkamaki *et al.*, 1999). Em contraste com outros estudos que verificaram efeitos positivos de sessões agudas ou crônicas do EE sobre os parâmetros de resistência à insulina, tais como a avaliação do modelo de homeostase de seres humanos (Drexel *et al.*, 2008; Paschalis *et al.*, 2011) e fosforilação de Akt (Ser473) (Katta *et al.*, 2009), demonstramos em estudo anterior (Pereira, B. C *et al.*, 2013) que o OTR/down diminui o conteúdo de pIRbeta (Tyr1146) e pAkt (Ser473) e aumenta o pIRS-1 (Ser307), pIKKalpha / beta (Ser176 / 180), pSAPK / JNK (Thr183 / Tyr185) quando comparado aos outros grupos experimentais. Dessa forma esses resultados confirmam os dados anteriores para o OTR/down e ainda demonstra a diminuição do conteúdo de GLUT4 translocado para a membrana e aumento nos níveis de NF-κB em amostras nucleares.

Em relação ao EE, os resultados estão em conformidade com Del Aguila et al (Del Aguila *et al.*, 2000), que mostraram um decréscimo na fosforilação em tirosina do IRS-1, uma associação entre a IRS-1 e PI3-K e um aumento na atividade de fosforilação em serina do Akt e atividade da Akt 24 horas após uma sessão aguda de corrida na descida, sendo essa executada por seres humanos. No entanto, quando observados os protocolos OTR/up e OTR, ambos demonstraram diminuição nos níveis protéicos da razão pIRbeta(Thr1146)/IRbeta, após injeção de insulina, quando comparado ao grupo CT, porém essa diminuição

não foi capaz de alterar os níveis protéicos da razão pIRS-1(ser307) / IRS-1, como também os níveis protéicos da razão pAKT(Ser473)/AKT com e sem ativação por insulina para o músculo EDL. No entanto, frente ao músculo Sóleo tanto o grupo OTR/up quanto OTR demonstraram menores níveis protéicos da razão pAKT(Ser473)/AKT como também diminuição do conteúdo de GLUT4 translocado para a membrana, assim caracterizando um estado de prejuízo da transdução da sinalização da insulina. Interessantemente, demonstramos que os protocolos de corrida com a mesma carga externa, mas realizados em aclone e sem inclinação, também foram capazes de induzir um estado de inflamação. Entretanto, vários estudos (Wei *et al.*, 2008; Hittel *et al.*, 2010; Pereira, B. C. *et al.*, 2013; Guo T, 2009) demonstraram que níveis protéicos elevados de IL-6 e TNF- α estão relacionados a danos na via de sinalização da insulina. Assim, são necessários mais estudos para explicar, os efeitos dos protocolos em aclone e sem inclinação, na relação entre as vias inflamatória e de sinalização da insulina.

6. Conclusão

Os três protocolos de *Overtraining* são capazes de desencadear um estado de *overreaching* não funcional (NFOR), sendo realizados com a mesma carga externa, e estão relacionados a um estado pró-inflamatório. No entanto, o protocolo de *overtraining* OTR/down foi o único capaz de aumentar o conteúdo da maioria das proteínas relacionadas ao estresse no Retículo Endoplasmático (RE) e desencadear prejuízo na via de sinalização da insulina em ambas amostras do músculo esquelético analisadas. Além disso, foi possível a interação acentuada entre essas duas vias de sinalização celular principalmente no protocolo de *overtraining* OTR/down. Vale salientar que OTR/up e OTR demonstraram ser capazes de causar prejuízo na transdução da sinalização da insulina e estresse no retículo endoplasmático quando observado amostras de músculo com composição de fibra predominante do tipo 1 (Sóleo). No entanto, não demonstraram alteração quando observado amostras de músculo com composição de fibra predominante do tipo 2 (EDL).

Com relação as citocinas pró-inflamatórias, as alterações também foram mais acentuadas para o protocolo de *overtraining* OTR/down em comparação com OTR/up e OTR. Os efeitos do OTR/up e do OTR no conteúdo das citocinas foi dependente do tipo de tecido analisado, enfatizando a especificidade da contração muscular predominante. Os dados reforçam a hipótese do papel das citocinas na etiologia do NFOR e síndrome do *overtraining* (OTS), indicando que estratégias nutricionais e fisioterapêuticas, para prevenção ou tratamento de inflamação podem ser utilizadas para evitar a diminuição do desempenho durante o treinamento intenso. Após recuperação total, o aumento da expressão de IL-10 e IL-15 pode ter influenciado no retorno aos níveis basais dos parâmetros de desempenho físico e de citocinas pró-inflamatórias.

A figura 12 demonstração de maneira esquemática os resultados obtidos na presente dissertação.

Figura 12: Demonstração esquemática dos resultados obtidos na presente dissertação.

Pesquisas futuras envolvendo supressão e/ou inibição de citocinas pró-inflamatórias são necessárias para garantir que NFOR e OTS não estão relacionadas com outros mecanismos moleculares.

Referências

ABRAHAM, W. M. FACTORS IN DELAYED MUSCLE SORENESS. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 9, n. 1, p. 11-20, 1977 1977. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1977DE88200002 >.

ARMSTRONG, L. E.; VANHEEST, J. L. The unknown mechanism of the overtraining syndrome - Clues from depression and psychoneuroimmunology. **Sports Medicine**, v. 32, n. 3, p. 185-209, 2002. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174452600003 >.

ARMSTRONG, R. B. MUSCLE DAMAGE AND ENDURANCE EVENTS. **Sports Medicine**, v. 3, n. 5, p. 370-381, Sep-Oct 1986. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986D977600006 >.

ARMSTRONG, R. B.; OGILVIE, R. W.; SCHWANE, J. A. ECCENTRIC EXERCISE-INDUCED INJURY TO RAT SKELETAL-MUSCLE. **Journal of Applied Physiology**, v. 54, n. 1, p. 80-93, 1983 1983. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983PZ41600012 >.

ARMSTRONG, R. B.; WARREN, G. L.; WARREN, J. A. MECHANISMS OF EXERCISE-INDUCED MUSCLE-FIBER INJURY. **Sports Medicine**, v. 12, n. 3, p. 184-207, Sep 1991. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991GB23000004 >.

ARNAOUT, M. A. STRUCTURE AND FUNCTION OF THE LEUKOCYTE ADHESION MOLECULES CD11 CD18. **Blood**, v. 75, n. 5, p. 1037-1050, Mar 1 1990. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990CQ87700001 >.

ASMUSSEN, E. POSITIVE AND NEGATIVE MUSCULAR WORK. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 28, n. 4, p. 364-382, 1953 1953. ISSN 0001-6772. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1953YC71900007 >.

ASP, S. et al. Eccentric exercise decreases maximal insulin action in humans: Muscle and systemic effects. **Journal of Physiology-London**, v. 494, n. 3, p. 891-898, Aug 1 1996. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VE39500023 >.

ASP, S.; KRISTIANSEN, S.; RICHTER, E. A. ECCENTRIC MUSCLE DAMAGE TRANSIENTLY DECREASES RAT SKELETAL-MUSCLE GLUT-4 PROTEIN. **Journal of Applied Physiology**, v. 79, n. 4, p. 1338-1345, Oct 1995. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TA62000039 >.

BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 276, n. 1, p. C120-C127, Jan 1999. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000078115300014 >.

BELCASTRO, A. N. SKELETAL-MUSCLE CALCIUM-ACTIVATED NEUTRAL PROTEASE (CALPAIN) WITH EXERCISE. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, n. 3, p. 1381-1386, Mar 1993. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993KV032000056 >.

BIGARD, A. X. Exercise-induced muscle injury and overtraining. **Science & Sports**, v. 16, n. 4, p. 204-215, Aug 2001. ISSN 0765-1597. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170654200004 >.

BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, Nov 2001. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172070300017 >.

BOLSTER, D. R. et al. Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. **Journal of Physiology-London**, v. 553, n. 1, p. 213-220, Nov 15 2003. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000186990200020 >.

BOPPART, M. D. et al. Eccentric exercise markedly increases c-Jun NH2-terminal kinase activity in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 5, p. 1668-1673, Nov 1999. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083675000015 >.

BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

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.

BYRNE, C.; TWIST, C.; ESTON, R. Neuromuscular function after exercise-induced muscle damage - Theoretical and applied implications. **Sports Medicine**, v. 34, n. 1, p. 49-69, 2004 2004. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188844400005 >.

CAMUS, G. et al. ARE SIMILAR INFLAMMATORY FACTORS INVOLVED IN STRENUOUS EXERCISE AND SEPSIS. **Intensive Care Medicine**, v. 20, n. 8, p. 602-610, Nov 1994. ISSN 0342-4642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PU43300016 >.

CARMICHAEL, M. D. et al. Recovery of running performance following muscle-damaging exercise: Relationship to brain IL-1 beta. **Brain Behavior and Immunity**, v. 19, n. 5, p. 445-452, Sep 2005. ISSN 0889-1591. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231275200011 >.

CARMICHAEL, M. D. et al. Role of brain IL-1 beta on fatigue after exercise-induced muscle damage. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 5, p. R1344-R1348, Nov 2006. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241106400019 >.

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, 1995.

CHEATHAM, B.; KAHN, C. R. INSULIN ACTION AND THE INSULIN SIGNALING NETWORK. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 2, p. 117-142, Apr 1995. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QT90200001 >.

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature reviews. Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-37, 2010.

CHIANG, J. et al. Honokiol protects rats against eccentric exercise-induced skeletal muscle damage by inhibiting NF-kappa B induced oxidative stress and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1-3, p. 119-127, May 21 2009. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266415600019 >.

CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-induced muscle damage in humans. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 81, n. 11, p. S52-S69, Nov 2002. ISSN 0894-9115. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178883700007 >.

CORNACHIONE, A. et al. Effects of eccentric and concentric training on capillarization and myosin heavy chain contents in rat skeletal muscles after hindlimb suspension. **Acta Histochem**, v. 113, n. 3, p. 277-82, 2011.

COSTILL, D. L. et al. EFFECTS OF REPEATED DAYS OF INTENSIFIED TRAINING ON MUSCLE GLYCOGEN AND SWIMMING PERFORMANCE. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 20, n. 3, p. 249-254, Jun 1988. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988N789200006 >.

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, 2011.

DA SILVA, A. S. R. et al. Exercise Intensity, Inflammatory Signaling, and Insulin Resistance in Obese Rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 12, p. 2180-2188, Dec 2010. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284353500005 >.

DAVIS, J. M. et al. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 6, p. R2168-R2173, Jun 2007. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247725300009 >.

DEL AGUILA, L. F. et al. Muscle damage impairs insulin stimulation of IRS-1, PI 3-kinase, and Akt-kinase in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and**

Metabolism, v. 279, n. 1, p. E206-E212, Jul 2000. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088127800026 >.

DONG, J. et al. Reverse Effects of DPI Administration Combined With Glutamine Supplementation on Function of Rat Neutrophils Induced by Overtraining. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 137-149, Apr 2013. ISSN 1526-484X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317641300005 >.

DONG, J. et al. NADPH Oxidase: a Target for the Modulation of the Excessive Oxidase Damage Induced by Overtraining in Rat Neutrophils. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 6, p. 881-891, 2011 2011. ISSN 1449-2288. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000208687900005 >.

DOYLE, J. A.; SHERMAN, W. M.; STRAUSS, R. L. EFFECTS OF ECCENTRIC AND CONCENTRIC EXERCISE ON MUSCLE GLYCOGEN REPLENISHMENT. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, n. 4, p. 1848-1855, Apr 1993. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993KZ59400053 >.

EBBELING, C. B.; CLARKSON, P. M. EXERCISE-INDUCED MUSCLE DAMAGE AND ADAPTATION. **Sports Medicine**, v. 7, n. 4, p. 207-234, Apr 1989. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989U475300001 >.

EIZIRIK DL, C. A., CNOP M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 1, p. 42-61, 2007.

ER, R. et al. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. **Diabetes**, v. 62, n. 2, p. 466-70, 2013.

ESSIG, D. A.; NOSEK, T. M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: A dual function of reactive oxygen species? **Canadian Journal of Applied Physiology-Revue Canadienne De Physiologie Appliquee**, v. 22, n. 5, p. 409-428, Oct 1997. ISSN 1066-7814. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997YA64800001 >.

EVANS, W. J. et al. METABOLIC CHANGES FOLLOWING ECCENTRIC EXERCISE IN TRAINED AND UNTRAINED MEN. **Journal of Applied Physiology**, v. 61, n. 5, p. 1864-1868, Nov 1986. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986E916700037 >.

FEBBRAIO, M. A. et al. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. **Journal of Physiology-London**, v. 544, n. 3, p. 957-962, Nov 1 2002. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179276500026 >.

FERNANDEZ-VELEDO, S. et al. c-Jun N-Terminal Kinase 1/2 Activation by Tumor Necrosis Factor- α Induces Insulin Resistance In Human Visceral But Not Subcutaneous Adipocytes: Reversal by Liver X Receptor Agonists. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3583-3593, Sep 2009. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269584600060 >.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-765, Aug 2007. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247575500011 >.

FIELDING, R. A. et al. ACUTE-PHASE RESPONSE IN EXERCISE .3. NEUTROPHIL AND IL-1-BETA ACCUMULATION IN SKELETAL-MUSCLE. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 1, p. R166-R172, Jul 1993. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LP43200083 >.

FISCHER, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 6-33, 2006.

FOSTER, C.; LEHMAN, M. **Overtraining syndrome**. Running Injuries GUTEN, G. N. Philadelphia: W.B. Saunders Company: pp. 173–188. p. 1997.

GARCIA-LOPEZ, D. et al. Effects of eccentric exercise on NF-kappa B activation in blood mononuclear cells. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 4, p. 653-664, Apr 2007. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245513600011 >.

GAUTSCH, T. A. et al. Availability of eIF4E regulates skeletal muscle protein synthesis during recovery from exercise. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 274, n. 2, p. C406-C414, Feb 1998. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000071884000015 >.

GIBALA, M. J. et al. CHANGES IN HUMAN SKELETAL-MUSCLE ULTRASTRUCTURE AND FORCE PRODUCTION AFTER ACUTE RESISTANCE EXERCISE. **Journal of Applied Physiology**, v. 78, n. 2, p. 702-708, Feb 1995. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QG47700044 >.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 9, p. 607-615, Sep 2011. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294250400004 >.

GOODMAN, C. A. et al. A Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B-independent Activation of Mammalian Target of Rapamycin Signaling Is Sufficient to Induce Skeletal Muscle Hypertrophy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 18, p. 3258-3268, Sep 15 2010. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281761300015 >.

GREGOR MF; GS., A. H. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunology and Cell Biology**, v. 415, n. 29, p. 45, 2011.

GUO T, J. W., CHANTURIYA T, PORTAS J, GAVRILOVA O, AND MCPHERRON AC. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. **Plos One**, v. 4, n. 3, p. e4937, 2009.

HAALAND, D. A. et al. Is Regular Exercise a Friend or Foe of the Aging Immune System? A Systematic Review. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 18, n. 6, p. 539-548, Nov 2008. ISSN 1050-642X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260862000008 >.

HALSON, S. L.; JEUKENDRUP, A. E. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. **Sports Medicine**, v. 34, n. 14, p. 967-981, 2004. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225916900003 >.

HALSON, S. L. et al. Immunological responses to overreaching in cyclists. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 5, p. 854-861, May 2003. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182714200020 >.

HAMADA, K. et al. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. **Faseb Journal**, v. 18, n. 14, p. 264-+, Nov 2004. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225482100007 >.

HIROSE, L. et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. **Exercise Immunology Review**, v. 10, p. 75-90, 2004 2004. ISSN 1077-5552. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227812600005 >.

HITTEL, D. S. et al. Myostatin Decreases with Aerobic Exercise and Associates with Insulin Resistance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 11, p. 2023-2029, Nov 2010. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283231900008 >.

HOHL, R. et al. Development and Characterization of an Useful Animal Model of Overtraining. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 5, p. S398-S398, May 2008. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000208070903276 >.

HORNBERGER, T. A. et al. Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 281, n. 1, p. C179-C187, Jul 2001. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169384100021 >.

HOUGH, T. Ergographic studies in muscular soreness. **American Journal of Physiology**, v. 7, n. 1, p. 76-92, Apr 1902. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000202300700004 >.

ISANEJAD, A. et al. The effect of endurance training and downhill running on the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha and HSP72 in rat skeletal muscle. **Cytokine**, v. 73, n. 2, p. 302-8, 2015.

ISNER-HOROBETI, M. E.; RASSENEUR, L.; AL., L.-W. E. E. Effect of eccentric vs concentric exercise training on mitochondrial function. **Muscle Nerve**, 2014.

JACOBS, B. L. Eccentric contractions increase the phosphorylation of tuberous sclerosis complex-2 (TSC2) and alter the targeting of TSC2 and the mechanistic target of rapamycin to the lysosome. **The journal of physiology**, 2013.

JESSEN, N. et al. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1373-1379, Apr 2003. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181426300010 >.

JEUKENDRUP, A. E. Modulation of carbohydrate and fat utilization by diet, exercise and environment. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 1270-1273, Dec 2003. ISSN 0300-5127. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000187289000037 >.

JIMENEZ-JIMENEZ, R. et al. Eccentric training impairs NF-kappa B activation and over-expression of inflammation-related genes induced by acute eccentric exercise in the elderly. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, n. 6, p. 313-321, Jun 2008. ISSN 0047-6374. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256867900003 >.

JP, K.; LF, A. D. A. Insulin signalling, exercise and cellular integrity. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. Pt 6, p. 1281-5, 2003.

K, V. et al. Attenuation of oxidant-induced muscle insulin resistance and p38 MAPK by exercise training. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 5, p. 593-9, 2009.

KEAST, D. et al. DEPRESSION OF PLASMA GLUTAMINE CONCENTRATION AFTER EXERCISE STRESS AND ITS POSSIBLE INFLUENCE ON THE IMMUNE-SYSTEM. **Medical Journal of Australia**, v. 162, n. 1, p. 15-18, Jan 2 1995. ISSN 0025-729X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995QA51800006 >.

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, 2014.

KIRWAN, J. P. et al. ECCENTRIC EXERCISE INDUCES TRANSIENT INSULIN RESISTANCE IN HEALTHY-INDIVIDUALS. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 6, p. 2197-2202, Jun 1992. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992HZ31700022 >.

KUBICA, N. et al. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2B epsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7570-7580, Mar 4 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227395700019 >.

LF, D. A.; KP, C.; JP, A. K. TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. **Am J Physiol**, v. 276, n. 5 Pt 1, p. E849-55, 1999.

LOLLO, P. C. et al. Differential response of heat shock proteins to uphill and downhill exercise in heart, skeletal muscle, lung and kidney tissues. **J Sports Sci Med**, v. 12, n. 3, p. 461-6, 2013.

LUEPKER, R. V. et al. Physical activity and cardiovascular health. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 276, n. 3, p. 241-246, Jul 17 1996. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UW46900038 >.

M, P.; K, V.; V, A. S. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 6, p. 1051-61, 2012.

MACKINNON, L. T. Overtraining effects on immunity and performance in athletes. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 5, p. 502-509, Oct 2000. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089857600006 >.

MARZETTI, E.; CARTER, C. S.; AL., W. S. E. Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction. **Mech Ageing Dev**, v. 130, n. 4, p. 272-80, 2009.

MCKUNE, A. J.; SEMPLE, S. J.; PETERS-FUTRE, E. M. ACUTE EXERCISE-INDUCED MUSCLE INJURY. **Biology of Sport**, v. 29, n. 1, p. 3-10, 2012 2012. ISSN 0860-021X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302425900001 >.

MEEUSEN, R. et al. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome: Joint consensus statement of the European College of Sport Science (ECSS) and the American College of Sports Medicine (ACSM). **European Journal of Sport Science**, v. 13, n. 1, p. 1-24, Jan 1 2013. ISSN 1746-1391. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312443500001 >.

MILES, M. P.; CLARKSON, P. M. EXERCISE-INDUCED MUSCLE PAIN, SORENESS, AND CRAMPS. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 34, n. 3, p. 203-216, Sep 1994. ISSN 0022-4707. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PW24300001 >.

MITSUMOTO, Y.; KLIP, A. DEVELOPMENTAL REGULATION OF THE SUBCELLULAR-DISTRIBUTION AND GLYCOSYLATION OF GLUT1 AND GLUT4 GLUCOSE TRANSPORTERS DURING MYOGENESIS OF L6 MUSCLE-CELLS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 7, p. 4957-4962, Mar 5 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HF64200098 >.

MURLASITS, Z.; LEE, Y.; POWERS, S. K. Short-term exercise does not increase ER stress protein expression in cardiac muscle. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 9, p. 1522-8, 2007.

NEWSHOLME, E. A. et al. A biochemical mechanism to explain some characteristics of overtraining. **Advances in Nutrition and Sport**, p. 79-83, 1991.

NEWTON, R. U.; GALVAO, D. A. Exercise in Prevention and Management of Cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 9, n. 2-3, p. 135-146, Jun 2008. ISSN 1527-2729. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000263030300005 >.

OGIHARA, T. et al. Insulin receptor substrate (IRS)-2 is dephosphorylated more rapidly than IRS-1 via its association with phosphatidylinositol 3-kinase in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 19, p. 12868-12873, May 9 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WY82900086 >.

OKAMOTO, M. M. et al. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. **Journal of Endocrinology**, v. 211, n. 1, p. 55-64, Oct 2011. ISSN 0022-0795. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295000500007 >.

ORDONEZ, R. et al. Understanding Nutritional Interventions and Physical Exercise in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Current Molecular Medicine**, v. 15, n. 1, p. 3-26, 2015.

OSBORN, O. et al. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 141-148, Oct 2008. ISSN 1043-4666. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260700600022 >.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-61, 2004.

PARK, K.-S. et al. Leukocyte apoptosis and pro-/anti-apoptotic proteins following downhill running. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 9, p. 2349-2357, Sep 2011. ISSN 1439-6319. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294963000042 >.

PASIAKOS, S. M. Exercise and Amino Acid Anabolic Cell Signaling and the Regulation of Skeletal Muscle Mass. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 740-758, Jul 2012. ISSN 2072-6643. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306799800012 >.

PAULI, J. R. et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **Journal of Physiology-London**, v. 586, n. 2, p. 659-671, Jan 15 2008. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252678800028 >.

PAULSEN, G. et al. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? **Exercise Immunology Review**, v. 18, p. 42-97, 2012 2012. ISSN 1077-5552. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306883500003 >.

PEAKE, J.; NOSAKA, K.; SUZUKI, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. **Exercise Immunology Review**, v. 11, p. 64-85, 2005. ISSN 1077-5552. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234203700007 >.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1379-1406, Oct 2008. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260072300004 >.

PEDERSEN, B. K. A. T. R. Exercise, glutamine and the immune system. In: (Ed.). **HALL, N. Y. C. A.** New York: Chapman & Hall, 1997a.

PEDERSEN, B. K. A. T. R. Exercise Immunology. In: HALL, C. (Ed.). **B. K. P. (Ed.).** . New York: Chapman & Hall, 1997b. p.75–88.

PEREIRA, B. C. et al. A new overtraining protocol for mice based on downhill running sessions. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 39, n. 9, p. 793-8, Sep 2012. ISSN 1440-1681. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632058> >.

PEREIRA, B. C. et al. Eccentric Exercise Leads to Glial Activation but not Apoptosis in Mice Spinal Cords. **International Journal of sport Medicine**, v. 36, n. 5, p. 378-85, 2015.

PEREIRA, B. C. et al. Eccentric Exercise Leads to Performance Decrease and Insulin Signaling Impairment. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 2013.

PEREIRA, B. C. et al. Nonfunctional Overreaching Leads to Inflammation and Myostatin Upregulation in Swiss Mice. **Int J Sports Med**, Jul 2013. ISSN 1439-3964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23868687> >.

PETERSEN, E. W. et al. Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 280, n. 6, p. C1570-C1575, Jun 2001. ISSN 0363-6143. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000168675500024 >.

PIERS, A. T. et al. Blockade of TNF in vivo using cVlq antibody reduces contractile dysfunction of skeletal muscle in response to eccentric exercise in dystrophic mdx and normal mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 21, n. 2, p. 132-141, Feb 2011. ISSN 0960-8966. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290245200010 >.

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, 2007.

PISTILLI, E. E.; QUINN, L. S. From anabolic to oxidative: reconsidering the roles of IL- 15 and IL-15 Ralpha in skeletal muscle. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 41, n. 2, p. 100-6, 2013.

POWELL, J. D. et al. Regulation of Immune Responses by mTOR. **Annual Review of Immunology**, Vol 30, v. 30, p. 39-68, 2012 2012. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304198100003 >.

RADAK, Z. et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: Evidence for beneficial outcomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 1-2, p. 69-74, Jul 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081654800009 >.

RIGAMONTI, E. et al. Macrophage plasticity in skeletal muscle repair. **BioMed Res Int**, v. 56, n. 06, p. 29, 2014.

ROBSON, P. J. Elucidating the unexplained underperformance syndrome in endurance athletes - The interleukin-6 hypothesis. **Sports Medicine**, v. 33, n. 10, p. 771-781, 2003 2003. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184888300004 >.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 519-29, 2007.

ROPELLE, E. R.; FLORES, M. B.; AL, C. D. E. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. **PLoS Biol**, v. 8, n. 8, 2010.

ROSA NETO, J. C.; LIRA, F. S.; OYAMA, L. M. E. A. Exhaustive exercise causes an antiinflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 106, n. 5, p. 697-704, 2009.

SALMINEN, A.; VIHKO, V. PROTEOLYTIC CAPACITY IN MOUSE CARDIAC-MUSCLE FOLLOWING STRENUOUS EXERCISE. **Experientia**, v. 37, n. 3, p. 226-227, 1981 1981. ISSN 0014-4754. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981LH11300010 >.

SB, J. et al. Deletion of skeletal muscle SOCS3 prevents insulin resistance in obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 1, p. 56-64, 2013.

SHELLER, J. et al. The pro- and antiinflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-88, 2011.

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, 2008.

SILVA, L. A. et al. Creatine supplementation does not decrease oxidative stress and inflammation in skeletal muscle after eccentric exercise. **J Sports Sci Med**, v. 31, n. 11, p. 1164-76, 2013.

SIMPSON, R. J. et al. Exercise and the aging immune system. **Ageing Research Reviews**, v. 11, n. 3, p. 404-420, Jul 2012. ISSN 1568-1637. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304977000007 >.

SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, n. 2, p. 317-331, Feb 2000. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085291400011 >.

SOCIETY. **Resource book for the design of animal exercise protocols**. [Internet]: Available from., 2006.

STEINACKER JM, L. W., REISSNECKER S, AND LIU Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. **European Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 4, p. 382-91, 2004.

STERN, S. E. et al. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 333-9, 2005.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R345-R353, Feb 2005. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226149300002 >.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 533-538, May 1998. ISSN 0008-4212. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077000200010 >.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 3-4, p. 222-231, Mar-Apr 2008. ISSN 1076-1551. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253938700016 >.

VINA, J. et al. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 1, p. 1-12, Sep 2012. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307101300001 >.

WALSH, N. P. et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 6-63, 2011.

WARREN, G. L.; LOWE, D. A.; ARMSTRONG, R. B. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. **Sports Medicine**, v. 27, n. 1, p. 43-59, Jan 1999. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000078470600004 >.

WEI, Y. et al. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative**

Physiology, v. 294, n. 3, p. R673-R680, Mar 2008. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253778700001 >.

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. 3463-41, 2009.

YU, J. G.; MALM, C.; THORNELL, L. E. Eccentric contractions leading to DOMS do not cause loss of desmin nor fibre necrosis in human muscle. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 118, n. 1, p. 29-34, Jul 2002. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177218100004 >.

ZEMBRON-LACNY, A. et al. Changes of Muscle-Derived Cytokines in Relation to Thiol Redox Status and Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Physiological Research**, v. 59, n. 6, p. 945-951, 2010. ISSN 0862-8408. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285711400012 >.