

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

RODRIGO LUIZ PERRONI FERRARESSO

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE
INDUÇÃO AO OVERREACHING EM
RATOS DIAGNOSTICADO ATRAVÉS DA
QUEDA DE DESEMPENHO E DA RAZÃO
GLUTAMINA/GLUTAMATO
PLASMÁTICA**

Campinas
2007

RODRIGO LUIZ PERRONI FERRARESSO

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE
INDUÇÃO AO OVERREACHING EM
RATOS DIAGNOSTICADO ATRAVÉS DA
QUEDA DE DESEMPENHO E DA RAZÃO
GLUTAMINA/GLUTAMATO
PLASMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
(Graduação) apresentado à Faculdade de
Educação Física da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Bacharel em Educação Física.

Orientador: Prof Dr. Rodrigo Hohl
Co-Orientador: Prof Dra. Denise Vaz de Macedo

Campinas
2007

RODRIGO LUIZ PERRONI FERRARESSO

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE INDUÇÃO
AO OVERREACHING EM RATOS DIAGNOSTICADO
ATRAVÉS DA QUEDA DE DESEMPENHO E DA
RAZÃO GLUTAMINA/GLUTAMATO PLASMÁTICA**

Este exemplar corresponde à redação final do Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) defendido por Rodrigo Luiz Perroni Ferrarezzo e aprovado pela Comissão julgadora em: 22/10/2007.

Rodrigo Hohl
Orientador

Sergio Augusto Cunha

Vera Aparecida Madruga Forti

Campinas
2007

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais e meu irmão, essa conquista é nossa, sem o apoio, o amor e a amizade de vocês nada disso seria possível, MUITO OBRIGADO!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS por ter colocado, e ainda colocar, em minha vida pessoas maravilhosas, pessoas essas que a cada dia me fazem entender um pouco mais sobre o verdadeiro sentido de nossas vidas!

Agradeço em especial aos meus pais LUIZ FERNANDO e RUTH, não existem palavras para descrever o que sinto por vocês, vocês dois foram, são e sempre serão exemplos a serem seguidos por mim, espero no futuro poder dar a meus filhos o mesmo amor que vocês sempre demonstraram por mim. Saibam que nunca esquecerei tudo o que vocês já fizeram por mim, todo o companheirismo, toda a ajuda, as palavras amigas, os conselhos, tudo, sei que em qualquer lugar que eu estiver eu sempre estarei em casa, pois sempre carrego vocês comigo no coração, obrigado por tudo.

Agradeço também ao meu irmão HENRIQUE, brow, você é o “cara” hehe..., a cada nova conquista obtida por você eu olho para trás e sempre me lembro daquele “molequinho”, as vezes meio rebelde, que dizia que não queria nada da vida, e vejo a pessoa que você se tornou. Cara eu tenho muito orgulho de você, que bom poder ter crescido e passado toda a minha infância com uma pessoa como você, obrigado por você existir!

Agradeço ainda a minha namorada PAULA. Você sabe que é muito mais do que uma namorada para mim, você é a companheira, a amiga, a pessoa que eu escolhi para passar todos os dias de minha vida, só você sabe como eu sou, me entende e me ergue quando necessário. É impossível não gostar de você, toda sua meiguice, carisma e coração fazem com que eu te admire cada dia mais. Te Amo!!!

Agradeço também a minha TIA MARA, a minha prima CIAMARA ao meu primo JOÃO RAFAEL (cara valeu por tudo, sempre que precisei você estava disposto a me ajudar, tenho muito orgulho de ser seu primo), a minha VÓ RUTH (vó eu quero chegar a sua idade com essa disposição invejável, você é um exemplo para mim, e deveria ser para todas as pessoas, continue assim, por muito tempo ainda, hein..hehe) e ao meu vô JOÃO.

Quero agradecer também a PROFa. DRA. DENISE VAZ DE MACEDO, obrigado por acreditar em mim e por ter me dado a chance de poder trabalhar junto a esse grupo maravilhoso de pessoas que formam o LABEX.

Ao PROF. DR. RENÉ BRENZIKOFER, agradeço por toda ajuda e por ter me ensinado um pouco mais sobre o maravilhoso mundo dos números e das análises estatísticas. Se hoje eu consigo olhar e questionar um dado é devido a tudo que o senhor me ensinou, obrigado.

FERRARESSO, Rodrigo. **Padronização de um modelo de indução ao overreaching em ratos diagnosticado através da queda de desempenho e da razão glutamina/glutamato plasmática**. 2007. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RESUMO

Atletas overtreinados apresentam redução de sua capacidade fisiológica funcional, entretanto os mecanismos biológicos responsáveis por tal acometimento ainda precisam ser melhor elucidados. Experimentos em modelo animal justificam-se quando a utilização de seres humanos é dificultada tendo em vista os impactos fisiológicos causados por um protocolo de indução ao overtraining. A avaliação da queda de desempenho é tida como o padrão ouro no diagnóstico do overtraining e recentemente foi sugerido que atletas bem adaptados a um protocolo de treinamento apresentariam uma razão Glutamina/Glutamato (Gm/Ga) plasmática de 3.58 a 5.88, enquanto atletas overtreinados apresentariam valores abaixo de 3.58. OBJETIVOS: Desenvolvimento de um modelo animal de indução ao overtraining em esteira avaliado através da queda de desempenho e da razão plasmática. MÉTODOS: 33 ratos machos da raça Wistar foram submetidos a 11 semanas de treinamento na esteira. Durante 8 semanas, os exercícios tiveram cargas crescentes de treinamento sendo realizados diariamente (Fase 1 – Treinamento Adaptativo – TA1 e TA2). Nas 3 semanas posteriores a carga de treinamento alcançada ao final da 8ª semana foi mantida, sendo a frequência de exercícios aumentada (2,3,4 vezes/dia) com uma redução no tempo de recuperação entre as sessões (4,3,2 horas), respectivamente. Oito testes de desempenho até a exaustão foram realizados: Antes do início do protocolo de treinamento (teste 0), após a 4ª semana de treinamento (teste 1), 8ª (teste 2), 9ª (teste 3), 10ª (teste 4) e 11ª (teste 5). Dois testes adicionais foram realizados após uma e duas semanas de repouso completo (testes 6 e 7). Dois grupos de animais foram determinados através da análise da variação angular da reta obtida pelos resultados dos testes de desempenho (3, 4 e 5). Grupo Alto Desempenho (AD – $\alpha > 0$) (N=13) e Grupo Baixo Desempenho (BD – $\alpha < 0$) (N=12). Dezesesseis ratos controle sedentários (CO) e oito ratos treinados (T) representando a fase 1 também foram analisados. RESULTADOS: O grupo BD apresentou uma queda persistente de desempenho após duas semanas de repouso quando comparado o teste 7 (148.9 ± 51.7 Kg.m) ao teste 3 (304.4 ± 119.7 Kg.m), possuindo ainda valores de desempenho similares aos do grupo controle (CO) no teste 7 (150.6 ± 97.8 Kg.m). O grupo AD manteve os valores encontrados de desempenho após o teste 3 (337 ± 144.6 Kg.m) até o teste 7 (297.5 ± 118.7 Kg.m). O grupo T apresentou níveis maiores de desempenho (478.9 ± 62.8 Kg.m) quando comparados ao grupo controle (CO) (175.6 ± 78.5 Kg.m). A razão Gm/Ga foi significativamente maior nos grupos T e AD (4.5 ± 1.7 e 4.5 ± 0.9) quando comparados aos grupos CO e BD (2.8 ± 0.5 e 3.1 ± 0.2). CONCLUSÕES: Esse modelo controlado e reprodutível de indução ao overtraining em modelo animal pode ser útil a fim de se explicar as hipóteses específicas dos mecanismos causadores da queda de desempenho induzidos por um desbalanço entre exercício e recuperação.

Palavras-Chaves: overreaching; desempenho; glutamina; glutamato; peso corporal; ratos

FERRARESSO, Rodrigo. **Standardization of overreaching model for rats detected by performance decrement and plasmatic glutamine/glutamate ratio**. 2007. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

ABSTRACT

Overtrained athletes show reduction of functional physiological capacity and its biological mechanisms still need to be elucidated. Experimental animal models are justified when it would not be appropriate to use human subjects for studies of exercise's impact. The evaluation of the performance decrement represents the gold standard for diagnosis of overtraining (OT) and recently it was suggested that athletes with acceptable performances would present a plasma Glutamine/Glutamate (Gm/Ga) ratio of 3.58 to 5.88, while overtrained athletes would present values below 3.58. **PURPOSE:** Development of an animal model of OT characterized by performance decrement and plasma Gm/Ga ratio. **METHODS:** 33 male Wistar rats were submitted to 11 weeks of running exercise. During 8 weeks, the exercises had increasing loads and were performed daily (Phase 1 - Adaptive Training). In the next 3 weeks, the load achieved at the 8th week was maintained and the daily frequency was increased (2, 3, 4 times) with a reduction in the recovery time between the sessions (4, 3, 2 hours). Eight performance tests until exhaustion were performed: before the beginning (1), after the 4th (2), 8th (3), 9th (4), 10th (5), 11th (6) weeks of training and after one and two weeks of complete resting (7 and 8). Two groups were detected by least square fit using tests 4, 5 and 6: Not Overtrained (NOTr - $\alpha \geq 0$) (N=13) and Overtrained (OTr - $\alpha < 0$) (N=12). A sedentary control group (CO; N=16) and a trained group (T; N=8), representing Phase 1 were also analyzed. **RESULTS:** OTr showed persisted performance decrement after 2 weeks of rest in test 8 (148.9 ± 51.7 Kg.m) compared with test 4 (304.4 ± 119.7 Kg.m) ($p < 0,05$) and closer to CO performance in test 8 (150.6 ± 97.8 Kg.m). NOTr maintained the performance after test 4 (337 ± 144.6 Kg.m) until test 8 (297.5 ± 118.7 Kg.m). T group showed higher performance level (478.9 ± 62.8 Kg.m) than CO (175.6 ± 78.5 Kg.m) ($p < 0,01$) in test 4. Plasma Gm/Ga was significantly higher in T and NOTr (4.5 ± 1.7 and 4.5 ± 0.9) than in the CO and OTr groups (2.8 ± 0.5 and 3.1 ± 0.2) ($p < 0,01$). **CONCLUSION:** This controlled and reproducible animal model of OT could be useful to test specific hypotheses to explain the causative mechanisms of performance decrement induced by an imbalance between the exercise and recovery time.

Keywords: overreaching; performance; glutamine; glutamate; body weight; rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exemplificação dos critérios adotados para seleção dos ratos BD e AD	20
Figura 2 -	Quantificação do desempenho dos ratos sedentários.....	22
Figura 3 -	Desempenho dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento.....	23
Figura 4 -	Gráfico comparativo do desempenho dos ratos com sangue coletado.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Protocolo de treinamento de 11 semanas.....	18
Tabela 2 -	Média ± DP da razão glutamina/glutamato.....	24
Tabela 3 -	Evolução da massa corporal (g) dos grupos CO (N=8), AD (N=5) e BD (N=4) nas três últimas semanas de treino e em PT1 e PT2.....	25
Tabela 4 -	Desempenho (Kg*m) dos grupos AD (N=5) e BD (N=4) nas três últimas semanas de treino e em PT1 e PT2.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Overtraining.....	12
1.2 Causas do Overtraining.....	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 Animais	16
2.2 Grupos de animais	16
2.3 Protocolo de treinamento.....	17
2.4 Testes de desempenho	18
2.5 Cálculo do desempenho.....	18
2.6 Seleção dos animais	19
2.7 Análises sanguíneas	20
2.8 Glutamina e Glutamato	21
2.9 Análise estatística	21
3 RESULTADOS	22
3.1 Efeito da maturação no desempenho dos ratos	22
3.2 Efeito do protocolo experimental	22
3.3 Relação glutamina/glutamato e desempenho	23
3.4 Evolução da massa e do desempenho dos grupos BD e AD após o término do protocolo de treinamento	25
4 DISCUSSÃO	27
5 REFERÊNCIAS	30

1 Introdução

O princípio da sobrecarga é um dos princípios do treinamento necessários para a adaptação dos tecidos. Ou seja, a modulação da intensidade, duração e frequência de esforço físico durante as sessões de treino, tem o objetivo de aumentar o rendimento em capacidades motoras diversas, que diferem em ordem de prioridade, dependendo da especificidade do trabalho muscular realizado (BOMPA, 2001). Sobrecarga no treinamento físico significa que o exercício realizado deve constituir-se num estímulo estressor suficiente para provocar distúrbios agudos, relacionados à fadiga nas células, órgãos e estruturas envolvidas com o movimento.

A resposta do organismo ao estresse do exercício ocorre através de ações integradas entre cérebro, glândulas, hormônios, sistema imune, coração, musculatura esquelética, sangue e pulmões, permitindo a adequação no fornecimento de combustível, oxigênio e energia; aumentos na força e resistência muscular, resistência à dor, acuidade mental, além de uma proteção temporária contra infecções. Ou seja, causar doença ou algum tipo de dano não é a função da resposta ao estresse. De uma maneira geral representa um mecanismo evolutivo conservado, pelo qual as células se defendem contra mudanças abruptas e adversas do meio ambiente, adaptando-se positivamente a elas (WELCH, 1993).

Uma periodização de treinamento associada ao princípio da sobrecarga normalmente resulta em graus variados de microtraumas na musculatura esquelética, tecido conectivo e/ou esqueleto e articulações, conhecido como microtrauma adaptativo (MTA), porque induz uma resposta inflamatória branda, com a função de reparo e regeneração dos tecidos lesionados (SMITH, 2000).

É importante ressaltar, no entanto, que as respostas adaptativas positivas que esperamos que aconteçam nas estruturas celulares alteradas pelo exercício, e que envolvem além do processo inflamatório, aumentos nas concentrações de reservas intramusculares de ATP, aumentos nas atividades de enzimas-chave do metabolismo e síntese de novas proteínas se iniciam quando cessa o exercício, no chamado período regenerativo.

Quando o tempo dedicado ao descanso é adequado em relação às cargas de esforço aplicadas, os níveis de atividade enzimática e de substratos metabólicos são restabelecidos acima daqueles detectados antes do treinamento, e as fibras musculares se regeneram plenamente dos traumas sofridos. Esse processo é conhecido na literatura como *supercompensação* e propicia melhor suprimento energético para exercícios que venham a requerer maior mobilização metabólica ou, ao contrário, uma economia de energia em atividades físicas que já eram habituais na estrutura do treinamento (FRY et al., 1992; BRUIN et al., 1994).

Resumindo, a aplicação do princípio da sobrecarga induz uma fadiga normal (*fadiga aguda de treinamento*), que é reversível, e a *supercompensação* ocorre com alguns dias de um período de carga de treinamento reduzida ou de descanso (micro-ciclo regenerativo). Trabalhos iniciais de Adolph (1964) já enfatizavam que o exercício físico induz uma alteração funcional nos sistemas por ele afetados, os quais respondem prontamente, na tentativa de restabelecer seus parâmetros de normalidade. Tal atividade biológica pode ser entendida como um ajuste regulatório, cujo objetivo é solucionar uma condição momentânea de perturbação.

1.1 OVERTRAINING

Overtraining é um termo geral, que indica um desequilíbrio entre cargas de esforço físico e período regenerativo, no sentido de aumentos no primeiro, resultando num estado de fadiga severa e prolongada (KUIPERS, KEIZER, 1988; STONE et al., 1991). Esse aumento no nível de estresse impossibilita a manutenção do desempenho num nível ótimo, mesmo após um período de recuperação apropriado (PLATEN, 2002a). A literatura denomina o *overtraining* de curta-duração de *overreaching*. Os sintomas do *overreaching* podem ser revertidos por um período regenerativo mais longo que o normal (FRY et al., 1991; KUIPERS, 1998; PETIBOIS, 2003).

O principal problema é que a transição entre fadiga aguda de treinamento, *overtraining* de curta-duração e *overtraining* de longa-duração é bastante tênue e qualquer descuido pode levar à instalação da síndrome do *overtraining*, um estado de fadiga severa e desempenho cronicamente diminuído. Este quadro geralmente é associado com um estado catabólico acentuado, alterações fisiológicas, alterações no processamento de informações psicológicas, alterações imunológicas, bioquímicas e aumento na susceptibilidade a lesões (FRY et al., 1991; TIIDUS, 1998;

LEHMANN et al., 1998). Ou seja, os sintomas do *overtraining* podem ser muito variados, mas uma vez a síndrome instalada, a única forma de tratamento é o repouso, e a recuperação é lenta (PETIBOIS, 2003).

Em esportes de alto nível, principalmente, essa queda no rendimento resultante do *overreaching/overtraining* pode ser confundida com falta de estímulos, e não com excesso. Essa conclusão equivocada muitas vezes leva a comissão técnica a aumentar a carga de exercícios dos atletas, diminuindo ainda mais o tempo destinado ao período de recuperação. Com isso, muitos atletas podem ultrapassar o limite de esforços que seu organismo pode suportar, tornando-se mais susceptíveis a lesões decorrentes do processo de *overreaching/overtraining* (SMOLKA et al., 2000; ZOPPI et al., 2003).

1.2 CAUSAS DO OVERTRAINING

Ainda não existe um consenso sobre a causa do *overtraining*, embora existam algumas hipóteses apresentadas na literatura. Elas incluem um papel do hipotálamo e ativação do sistema nervoso autônomo (LEHMANN et al., 1998; PLATEN, 2002b), assim como o envolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gônadas, resultando na alteração nos níveis plasmáticos de catecolaminas, glicocorticóides e testosterona (FRY, KRAMER, 1997). Outra proposição sugere que o alto grau de fadiga que caracteriza o *overreaching* pode ser decorrente de uma proteólise acentuada, que aconteceria principalmente em situações de reposição parcial das reservas de glicogênio muscular pós-exercícios ou jogos (COSTILL et al., 1988).

Há também a proposição de que uma redução nos níveis circulantes do triptofano estaria refletindo uma maior captação desse aminoácido pelo cérebro (NEWSHOLME et al., 1991). Como o triptofano é o precursor do neurotransmissor serotonina, isso explicaria as alterações no comportamento e humor, como aumento no sono e diminuição do apetite.

Uma hipótese de caráter integrador (SMITH, 2000) propõe que o iniciador do *overreaching/overtraining* no atleta submetido a treinos intensos e com pouco tempo de recuperação seria uma progressão do estágio benigno dos micro-traumas adaptativos induzidos na musculatura esquelética e articulações para um estágio de dano sub-clínico (PERRY, 1992;

ALMEIDA et al., 1999). Ou ainda, em uma circunstância de reinício de treinamento antes da recuperação total de um dano agudo, o que poderia exacerbar o dano inicial (STONE et al., 1991; SHEPHERD, SHEK, 1998; SMITH, 2000). Segundo essa proposta, a inflamação local aguda que ocorre em resposta aos traumas se tornaria crônica, e as citocinas liberadas durante esse processo ativariam monócitos circulantes a produzir mais citocinas pró-inflamatórias, resultando num processo inflamatório sistêmico, que seria o desencadeador do *overtraining*.

A elevação na produção de espécies reativas de O₂ (EROs), que acompanha o aumento da atividade contrátil muscular (DAVIES et al., 1982; ALESSIO, 1993) parece ser importante tanto para a adaptação positiva quanto para o início do dano muscular induzido pelo exercício e o início e propagação da resposta inflamatória subsequente (REID, 2001). Vassilakopoulos e colaboradores (2003) sugeriram que o estresse oxidativo é o principal estímulo para a indução da produção de citocinas no exercício físico, uma vez que as EROs podem atuar como mediadores de vias de transdução de sinais, capazes de induzir a síntese de citocinas em diversos tipos celulares.

Trabalhos publicados na literatura, utilizando os mais diversos protocolos de treinamento em animais ou humanos mostraram tanto aumento quanto diminuição na atividade das enzimas da defesa antioxidante em função do protocolo de exercício utilizado (JI, 1993; POWERS et al., 1994; ESSIG, NOSEK, 1997), reforçando a proposta de modulação da atividade dessas enzimas pela concentração de EROs (REID, 2001; JI, 2002). Nesse sentido, resultados prévios do nosso laboratório mostraram que o tipo de atividade física (contínua ou intermitente) parece ser importante na quantidade de EROs produzida durante os esforços e sua consequente ação sobre a atividade das enzimas CAT (catalase) e GR (glutathiona redutase) (SMOLKA et al., 2000). Os autores observaram que ambos os treinamentos levaram a um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes, mas que o treinamento contínuo produzia o dobro de resposta que o intermitente, que por sua vez foi mais lesivo e mais eficiente para aumentar a capacidade oxidativa do músculo sóleo (SMOLKA et al., 2000).

Recentemente foi sugerido que alterações na razão glutamina/glutamato, no sentido de diminuição da primeira e aumento da segunda, poderiam ser utilizadas para se classificar um possível estado de *overtraining* (HALSON et al., 2003; SMITH, NORRIS, 2000). A teoria da glutamina propõe que, como esse aminoácido é o principal substrato energético dos linfócitos, a diminuição na concentração sanguínea de glutamina seria a responsável pela diminuição na

resposta imune, associada com o aumento na frequência de infecções observadas no *overtraining* (NEWSHOLME et al., 1991). Já a teoria do glutamato indica que, devido ao fato desse aminoácido ser carregado por transportadores dependentes do gradiente eletroquímico de Na^+ , a instalação de um dano, no caso muscular, poderia aumentar o influxo de Na^+ para o interior da célula muscular, impossibilitando a entrada do aminoácido na mesma, gerando assim um aumento na concentração de glutamato no meio extracelular (MCGIVAV, PASTOR ANGLADA, 1994; TURISKY, GONNERMAN, 1982).

Pelo exposto acima, fica evidente que um dos grandes desafios dos profissionais da área do esporte é compreender melhor as relações entre quantidade ótima de treinamento e os fatores que influenciam a recuperação. Isto auxiliaria os preparadores físicos na modulação correta tanto das cargas de treino quanto do período de recuperação, com o objetivo de alcançar a supercompensação e evitar a instalação de *overreaching/overtraining*.

Uma maneira interessante seria o acompanhamento de biomarcadores sanguíneos durante o processo de treinamento, que possibilitasse a diferenciação entre fadiga aguda do treinamento/*overreaching/overtraining*. Contudo, ainda não existe descrita uma forma objetiva de se determinar esse *continuum* sem equívocos. A concordância entre os autores é que a queda de desempenho é necessária para o diagnóstico do *overtraining*. Em humanos nem sempre todas as capacidades motoras são afetadas simultaneamente ou são impactadas no mesmo grau, tornando sua interpretação confusa (SMITH, 2000). Um outro complicador é que não existe ainda descrito na literatura um protocolo de exercícios utilizando ratos como modelo experimental com o objetivo de induzir esse *continuum* entre fadiga aguda de treinamento (*supercompensação/overreaching/overtraining*).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi aplicar um protocolo controlado de treinamento em ratos contendo um período de desequilíbrio entre o estímulo do exercício e a recuperação que gerasse queda de desempenho aferida num teste até a exaustão. Analisamos a relação glutamina/glutamato (Gm/Ga) no sangue a fim de validar o modelo como uma ferramenta na investigação dos mecanismos causadores da queda de desempenho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Utilizamos inicialmente 60 ratos da raça Wistar com 60 dias de vida, pesando entre 200 – 250g, alimentados com ração e água *ad libitum*. Durante todo o período de experimento os animais foram mantidos em ambiente com a temperatura controlada entre 18 e 22°C e fotoperíodo de 12 horas com ciclo de luz claro-escuro invertido. Todos os ratos foram adaptados a esteira rolante durante duas semanas antes do início dos experimentos. A fase de adaptação consistiu em colocá-los na esteira 5 dias/semana durante 10 minutos com velocidade de 12m/min. Essas semanas iniciais tiveram como finalidade separar os animais que corriam voluntariamente daqueles que se recusavam a correr, para que apenas realizassem os testes os animais que corressem voluntariamente. O protocolo experimental aplicado nos animais foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (638-1).

2.2 GRUPOS DE ANIMAIS

Dos 60 ratos inicialmente utilizados, 49 foram selecionados para serem submetidos aos experimentos. Desses, 33 ratos foram alocados para o grupo que realizou o protocolo de treinamento em esteira, sendo os 16 restantes utilizados como grupo controle. Por fim, dos dezesseis ratos que compuseram o grupo controle (CO), 8 deles foram submetidos somente aos testes de desempenho até o final do protocolo de treinamento, com o objetivo de verificarmos se o processo de crescimento influenciaria na quantificação do Trabalho (W) realizado pelos animais. Os demais oito ratos CO foram sacrificados ao término do período de experimentos para a retirada do sangue e análise da razão glutamina/glutamato. Cabe ressaltar que os testes de

desempenho realizados nos ratos do grupo CO foram feitos nas semanas correspondentes aos testes realizados durante o período de treinamento, e no mesmo tempo de vida dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento.

2.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Os animais do grupo CO, que realizaram unicamente os testes de desempenho (N=8), foram submetidos a 10 minutos de esteira com velocidade de 12 m/min duas vezes na semana durante todo o período de análise, excetuando as semanas destinadas ao teste de desempenho. Já os 33 ratos, alocados para o treinamento, foram submetidos a um protocolo de treino (Tabela I) que buscou estabelecer um continuum entre adaptação/overreaching/overtraining. As quatro primeiras semanas foram dimensionadas para ser um treinamento adaptativo (TA1), onde velocidade e tempo de corrida foram aumentados progressivamente a cada semana. Nas quatro semanas posteriores (TA2) manteve-se a velocidade e o tempo de corrida atingidos ao final de TA1. Já nas 3 semanas seguintes procurou-se estabelecer um desequilíbrio entre estímulo e recuperação nos animais treinados, aplicando a mesma carga de TA2 mas aumentando-se o número de sessões diárias de treino para duas (T2x), três (T3x) e quatro (T4x) vezes, com diminuição no tempo de recuperação entre as sessões (4, 3 e 2 h, respectivamente). Os testes de desempenho foram realizados ao final de cada etapa do treinamento, sendo assim dispostos (Tabela 1): Teste (0), realizado após o período de adaptação dos animais; Teste (1), realizado após TA1; Teste (2), realizado após TA2; Teste (3), realizado após o treinamento de duas sessões diárias (T2x); Teste (4), realizado após o treinamento de três sessões diárias (T3x) e Teste (5), realizado após o treinamento de quatro sessões diárias (T4x). Dois testes adicionais (PT1 e PT2) foram realizados nas duas semanas após o término do protocolo de treinamento, a fim de acompanhar a evolução do desempenho na ausência do treinamento. A massa corporal também foi aferida nos momentos em que foram realizados os testes.

Tabela I. Protocolo de treinamento de 11 semanas.

Semanas Experimentais	Fases do Treino	Número dos Testes	Velocidade do Treino (m/min)	Duração do Treino (min)	Número de Sessões diárias	Recuperação entre as sessões (h)
	Adaptação	0	--	--	--	--
1 ^a	TA1	semana sem testes	15	20	1	--
2 ^a	TA1	semana sem testes	20	30	1	--
3 ^a	TA1	semana sem testes	22,5	45	1	--
4 ^a	TA1	1	25	60	1	--
5 ^a a 7 ^a	TA2	semana sem testes	25	60	1	--
8 ^a	TA2	2	25	60	1	--
9 ^a	T2x	3	25	60	2	4
10 ^a	T3x	4	25	60	3	3
11 ^a	T4x	5	25	60	4	2
12 ^a	PT1	6	sem treinos	sem treinos	--	--
13 ^a	PT2	7	sem treinos	sem treinos	--	--

2.4 TESTES DE DESEMPENHO

Todos os testes iniciaram-se com os animais correndo em esteira, sem inclinação, na velocidade inicial de 12 m/min. A cada 2 min incrementou-se a velocidade em 1 m/min até que fosse atingido 20 m/min. A partir dessa velocidade o incremento da esteira passou a ser de 2 m/min a cada 3 minutos até que o animal atingisse a exaustão. A exaustão foi definida no momento que os animais tocaram a grade eletrificada da esteira cinco vezes em um minuto (Liu et al. 2000).

2.5 CÁLCULO DO DESEMPENHO

Para avaliar longitudinalmente o efeito do treinamento nos ratos é necessário que o teste quantifique o desempenho do animal de maneira independente da variação de massa. Segundo Alexander (2005) toda força é proporcional ao peso do corpo durante o movimento. Portanto, a potência mecânica é o produto entre massa e velocidade, e o trabalho mecânico realizado é o produto entre potência e tempo. Como nosso teste de desempenho é um teste incremental sendo realizado na forma de multi-estágios, a distância total “D” percorrida pelos ratos nesses multi-estágios do teste de desempenho ($i= 1,2,3,4...$) pode ser calculada através do produto da velocidade “ V_i ” realizada em cada estágio, pelo tempo “ T_i ” de duração de cada estágio. Dessa

forma temos que: $D = \sum D_i = \sum V_i * T_i$, podemos calcular assim uma grandeza relacionada ao trabalho mecânico realizado durante o teste multi-estágio (equação 1)

$$W = \Sigma W = m * D \quad \text{equação 1}$$

onde: (W) representa o trabalho mecânico total realizado pelo rato; (m) = massa; (D) = distância total percorrida pelo rato ao longo do teste. W não é o trabalho mecânico definido pela física, mas uma quantificação proporcional ao trabalho. Ao envolver a massa do animal esta variável W permite comparar as performances dos ratos longitudinalmente. Neste trabalho W será expresso em kg*m.

2.6 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Ao término do treinamento, os 33 ratos do grupo treinado foram divididos em três sub-grupos: Treinados (T), Baixo Desempenho (BD) e Alto Desempenho (AD), selecionados conforme descrito a seguir:

Os animais que compuseram o grupo T (N=8) foram selecionados, através de sorteio, entre os 33 ratos que terminaram a nona semana de treinamento com nível de desempenho acima da mediana no teste 3 (T2x) (Tabela 1), teste esse onde foram encontrados os maiores valores de desempenho de todo o protocolo. Os grupos BD e AD foram selecionados após o teste 5 (T4x). O valor do trabalho realizado por cada rato nos vários testes de desempenho representaram um ponto no plano cartesiano, sendo traçada uma reta a partir do ponto referente ao teste 3 (T2x) de cada animal (período onde os ratos estão adaptados ao treinamento diário), terminando no ponto referente ao teste 5 (T4x) (final do treinamento, com 4 sessões diárias intercaladas por 2 h de descanso entre elas). Este procedimento identificou no final do protocolo dois grupos de ratos: aqueles que apresentaram baixo desempenho (BD) (N=12), oriundo dos animais cuja variação angular da reta foi MENOR que zero ($\alpha < 0$) e aqueles que apresentaram aumento do desempenho (AD) (N=13), composto pelos animais cuja variação angular da reta, no mesmo período de

análise foi MAIOR que zero ($\alpha > 0$) (Figura 1 A e B). Desse total de 12 e 13 ratos dos grupos BD e AD, respectivamente, oito ratos de cada grupo foram sacrificados para a retirada do sangue. Os quatro ratos restantes do grupo BD e os cinco ratos restantes do grupo AD foram avaliados em dois testes de desempenho (PT1 e PT2) realizados após 1 e 2 semanas de repouso.

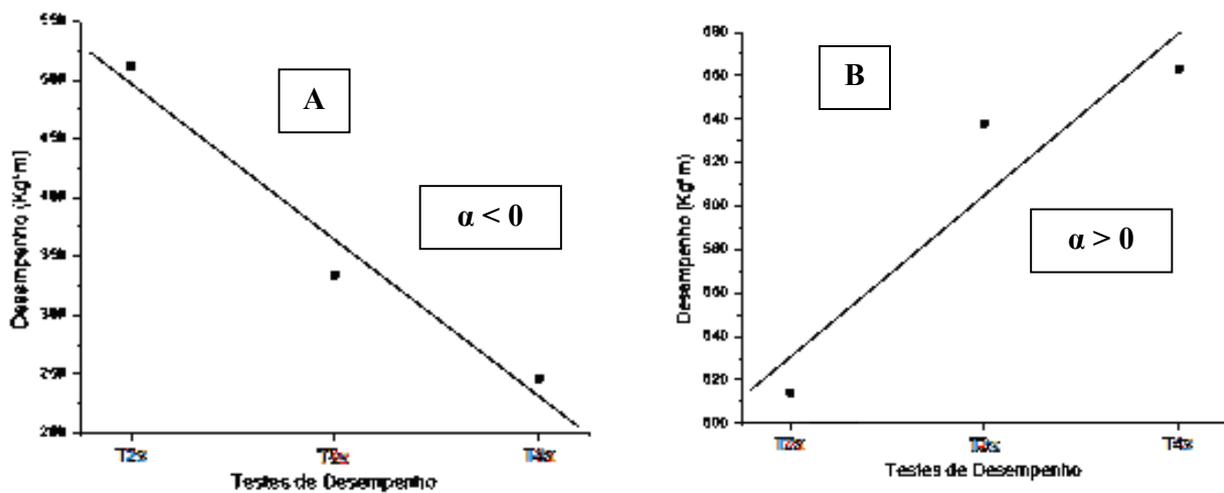


Figura 1 - Exemplificação dos critérios adotados para seleção dos ratos BD (figura A) e AD (figura B).

2.7 ANÁLISES SANGUÍNEAS

O sangue foi extraído através de punção cardíaca após 60 horas da realização do teste de desempenho. Foram analisados quatro grupos: (1) Treinados (T) (N = 8) sacrificados após o teste 3 (T2x); (2) Controle (CO) sacrificados após o teste 4 (T3x) (N = 8); (3) BD (N = 8); (4) AD (N = 8), sacrificados após o teste 5 (T4x). Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral 20% (0,3 ml por 100g de massa) e o sangue extraído foi imediatamente desproteinado com ácido perclórico 10% e centrifugado à 3000g por 5 minutos (4°C). O sobrenadante foi neutralizado com KOH e recentrifugado nas mesmas condições. As amostras foram armazenadas á -80° C.

2.8 GLUTAMINA E GLUTAMATO

A análise do glutamato foi realizada na presença da enzima glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.3) e NAD⁺, medindo-se em espectrofotômetro Beckmam DU-640 a formação de NADH (339 nm). As amostras para a análise de glutamina ficaram incubadas à 37°C em solução contendo glutaminase (EC 3.5.1.2). O método de análise foi feito segundo Lund (1985).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de desempenho estão mostrados em boxplot para análise descritiva. As análises dos resultados e as estatísticas foram feitas através do programa MatLab® 7.0. Utilizamos o teste ANOVA para amostras pareadas e não pareadas com pós-teste de Tukey. Também utilizamos o teste t para comparação entre dois grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITO DA MATURAÇÃO NO DESEMPENHO DOS RATOS

A Figura 2 mostra os resultados dos testes de desempenho realizados nos ratos do grupo controle (N=8). Observa-se um decréscimo significativo do desempenho do teste 0 para os demais testes (1-7) ($p < 0.001$). A partir do teste 1 não encontramos mais diferença significativa no desempenho.

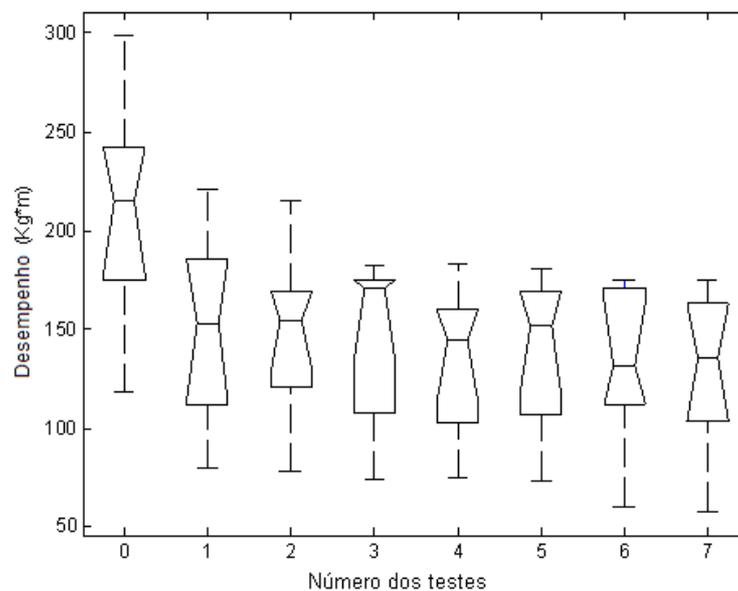


Figura 2 - Quantificação do desempenho dos ratos sedentários (CO) (N=8) do teste 0 ao teste 7. Diferença significativa ($p < 0.001$) do teste 0 para os demais testes.

3.2 EFEITO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A Figura 3 mostra os resultados do teste de desempenho em todos os períodos do treinamento. Os boxplot branco contêm o desempenho de todos os grupos de ratos (TO = T + BD

+ AD) exceto a partir do teste 4 (T3x) onde encontram-se representados apenas os ratos do grupo AD e BD, visto os ratos do grupo treinado (T) já terem sido sacrificados nesse momento do experimento. Os dados analisados dessa forma mostram não haver diferenças no desempenho quando comparado o teste 1 (TA1) aos demais testes. Os boxplot preto (BD) e cinza (AD) mostram o desempenho dos grupos previamente selecionados. Podemos observar nos boxplots preto que o desempenho do grupo BD (N=12) foi significativamente menor após o teste 4 (T3x) ($p < 0.05$) e 5 (T4x) ($p < 0.01$) quando comparados ao teste 3 (T2x). Não houve diferença significativa no grupo AD após os testes 4 (T3x) ou 5 (T4x) quando comparados ao teste 3 (T2x).

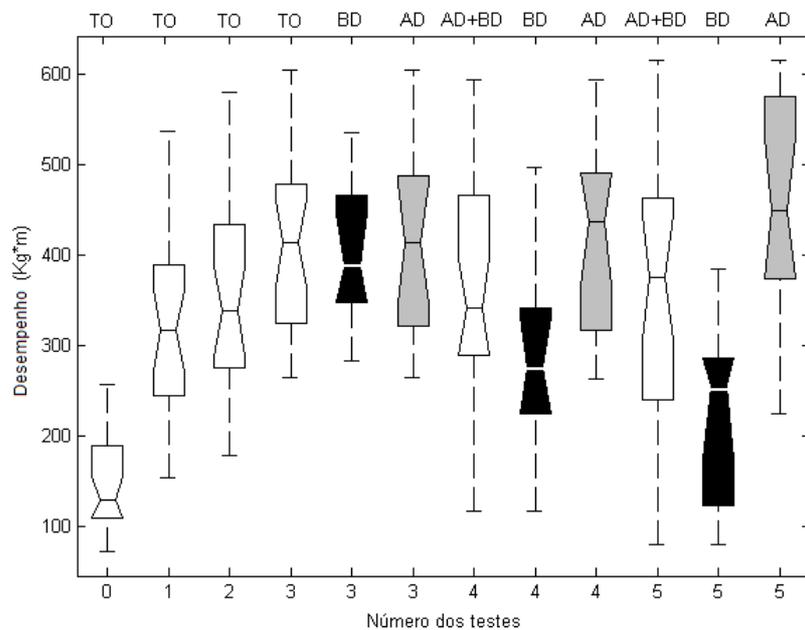


Figura 3 - Desempenho dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento nos testes 0-5. Segundo o critério de seleção os ratos foram subdivididos nos seguintes grupos: Caixa branca, representa todos os ratos (TO=T+BD+AD) (N=33) exceto nos testes 4 e 5 (AD+BD) (N=25); Caixa preta, representa o grupo baixo desempenho (BD) (N=12); e a caixa cinza representa o grupo alto desempenho (AD) (N=13).

3.3 RELAÇÃO GLUTAMINA/GLUTAMATO E DESEMPENHO

A Figura 4 ilustra a evolução do desempenho ao longo do protocolo de treinamento dos ratos sacrificados para análise dos aminoácidos no sangue em três momentos: 1- antes do treinamento (teste 0); 2- após teste 3 (T2x); 3- após teste 5 (T4x). O boxplot branco representa o desempenho dos ratos do grupo CO. Os boxplot tracejados representam o grupo T sacrificados

após o teste 3; os boxplot preto o grupo BD, e os cinzas o grupo AD, ambos sacrificados após o teste 5. Observa-se que no momento do sacrifício do grupo T os grupos BD e AD apresentavam valores similares no desempenho. O grupo BD, no momento da coleta de sangue (após o teste 5), demonstrou uma queda significativa no desempenho em relação ao teste 3 (T2x) ($p < 0.001$), mas ainda superior ao seu próprio teste inicial (teste 0) e ao controle na mesma semana ($p < 0.05$). Já o grupo AD se encontrava com o desempenho aumentado significativamente após o teste 5 (T4x) quando comparada ao teste 0 ($p < 0.001$) e em relação ao grupo BD no mesmo momento (teste 5) ($p < 0.001$).

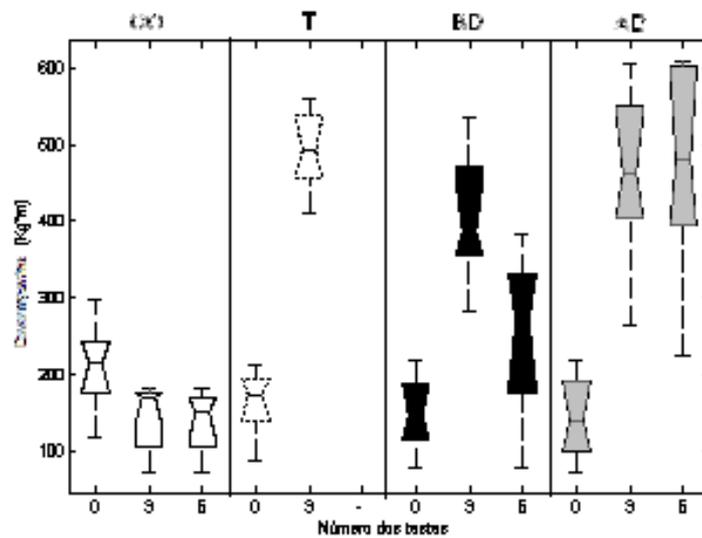


Figura 4: Gráfico comparativo do desempenho dos ratos com sangue coletado. Controle (CO) (N=8), T (N=8), Baixo Desempenho (BD) (N=8) e Alto Desempenho (AD) (N=8).

A Tabela 2 mostra a relação glutamina/glutamato no plasma dos três grupos de ratos. A relação glutamina/glutamato foi significativamente maior nos grupos T e AD em relação ao CO e BD ($p < 0,01$).

Tabela 2: Média \pm DP da razão glutamina/glutamato.

Aminoácidos Plasmáticos	CO	T	AD	BD
Glutamina/Glutamato	2.8 \pm 0.5	4.5 \pm 1.7 ^a	4.5 \pm 0.9 ^a	3.1 \pm 0.2
N	8	8	8	8

^a diferença significativa para CO e BD ($p < 0,01$)

3.4 EVOLUÇÃO DA MASSA E DO DESEMPENHO DOS GRUPOS BD E AD APÓS O TÉRMINO DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Após o término do treinamento de 11 semanas, 4 ratos do grupo BD e 5 ratos do grupo AD foram selecionados aleatoriamente com o objetivo de se analisar a evolução do desempenho e da massa na 1ª semana pós-treino (PT1) e 2ª semana pós-treino (PT2). Os resultados da evolução das massas dos animais estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Evolução da massa corporal (g) dos grupos CO (N=8), AD (N=5) e BD (N=4) nas três últimas semanas de treino e em PT1 e PT2.

Fases do treino	Massa Corporal (g)		
	CO	AD	BD
T2X	422.2 ± 23.1 ^a	386.4 ± 17.2	370 ± 15.8
T3X	425.3 ± 30.1 ^a	369.2 ± 9.6	360.5 ± 21.6
T4X	432.9 ± 26.9 ^{bc}	351.8 ± 8.1 ^c	342 ± 8.0 ^d
PT1	443.7 ± 25.3 ^{be}	386.2 ± 19.0 ^f	339 ± 7.0 ^c
PT2	445.2 ± 31.4 ^{ge}	405 ± 29.0	374.5 ± 9.3

Os dados estão apresentados como média ± DP. ^a diferença significativa para AD e BD ($p < 0.01$). ^b diferença significativa para AD e BD ($p < 0.001$). ^{c, d, e} diferença significativa para teste 3 (T2x) em comparação pareada intra-grupos ($p < 0.05$, < 0.01 , 0.001 , respectivamente). ^f diferença significativa para BD ($p < 0.05$). ^g diferença significativa para BD ($p < 0.01$).

Na comparação entre os grupos podemos observar que o grupo CO sempre aumentou a massa corporal ao longo das avaliações, com valores significativamente maiores que BD e AD até PT1 ($p < 0.01$ e $p < 0.001$). Em PT2 observamos diferença significativa somente entre o CO e BD ($p < 0.01$) O grupo AD recuperou a massa em PT1, não havendo mais diferença significativa para T2x enquanto o mesmo não ocorreu com o grupo BD. Em PT1 o grupo AD apresentava massa significativamente aumentada em relação ao grupo BD ($p < 0.05$), sendo que esta diferença deixa de ser significativa em PT2.

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de desempenho após T2x até PT2 ($n=9$) dos grupos AD e BD. Não houve diferença significativa em nenhum dos momentos analisados no grupo AD, com uma tendência de diminuição no desempenho em PT1 e PT2. Houve diminuição

significativa do desempenho no grupo BD após T4x (teste 5), PT1 (teste 6) e PT2 (teste 7) em relação à T2x (teste 3) ($p < 0,05$).

Tabela 4. Desempenho (Kg*m) dos grupos AD (N=5) e BD (N=4) nas três últimas semanas de treino e em PT1 e PT2.

Fases do treino	Desempenho (kg m)	
	<i>AD</i>	<i>BD</i>
T2x	372.4 ± 60.1	331.5 ± 77.4
T3x	337.4 ± 144.6	304.4 ± 119.7
T4x	389.6 ± 87.9	150.9 ± 62.7 ^a
PT1	364.9 ± 32	153.0 ± 58.5 ^a
PT2	297.5 ± 118.7	148.9 ± 51.7 ^a

Os dados estão apresentados como média ± DP. ^a diferença significativa em relação a T2x ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A avaliação do decréscimo de desempenho ainda representa o “padrão ouro” de diagnóstico da síndrome do overtraining (URHAUSEN, KINDERMANN 2002). Enquanto o overtraining não estiver bem compreendido, treinadores e atletas continuarão a verificar a existência do overtraining em testes específicos que devem prosseguir até a exaustão (ARMSTRONG, VANHEEST 2002), uma vez que os testes até a exaustão parecem demonstrar maiores alterações no desempenho em situação de overreaching ou overtraining (HALSON, JENKERDRUP 2004). Partimos desta premissa para avaliar os efeitos do protocolo de treinamento aplicado em ratos *Wistar*, uma vez que somente o aumento da carga de treinamento pelo aumento da frequência diária não poderia ser justificativa suficiente para atestar o modelo como instrumento de investigação do overreaching/overtraining. Os resultados apresentados na Figura 2 mostraram que o crescimento dos ratos não influenciou no resultado do teste realizado pelos ratos sedentários, cujo desempenho não sofreu alterações significativas a partir do teste 1, que corresponde a três meses de vida dos animais.

A confiança no teste de desempenho é fundamental para o diagnóstico do overreaching/overtraining, pois conforme Halson et al., (2004), caso o desempenho for medido e permanecer sem alterações após o aumento das cargas de treinamento, por definição o indivíduo não pode ser considerado como em estado de overtraining.

Os dados apresentados na Figura 3 mostram claramente isso. Quando não há a seleção dos ratos (boxplot branco) através do teste de desempenho, conclui-se que todos os ratos responderam de forma similar ao aumento de cargas determinado pelo aumento da frequência diária de treinamento. Contudo, quando separamos os ratos pelo desempenho em BD e AD, observamos respostas diferenciadas dos dois grupos ao aumento de cargas.

Muitos trabalhos apontam a perda de massa como um dos sintomas de overtraining (MCKENZIE, 1923; CARLIE, 1963; KARPOVICH, SINNING 1971; LEHMAN, 1993; FROEHLICH, 1995; SMITH, 2000; ARMSTRONG, VANHEEST 2002). A aferição da massa corporal ao longo das semanas de treinamento (Tabela 3) nos grupos CO, BD e AD confirmam

que a aplicação de um teste de desempenho é fundamental para a investigação dos sintomas e mecanismos de causa do overtraining. Nossos dados mostraram que apenas a aferição da massa não é suficiente para se diagnosticar overreaching ou overtraining, visto que tanto BD quanto AD perderam massa durante o treinamento intenso, porém isso não se refletiu igualmente no desempenho (Tabela 4). O grupo AD manteve o desempenho enquanto o grupo BD diminuiu em 50% o desempenho no teste de exaustão. Interessante notar que apesar do mesmo comportamento das massas nos grupos BD e AD durante o treinamento, a recuperação da mesma após a suspensão do treinamento foi mais rápida no grupo AD, que apresentou um valor igual à T2x após PT1 enquanto o grupo BD atingiu esta meta com uma semana a mais de repouso completo (PT2). Ainda assim, o grupo BD apresentou um valor médio da massa significativamente menor do que o grupo CO. Esses dados sugerem que os mecanismos que levam a perda de massa corporal intensa estiveram igualmente atuantes nos dois grupos (BD e AD) enquanto houve o aumento de cargas. A diferença entre eles pode residir nos mecanismos de recuperação após esforço, que pode estar mais eficiente nos ratos do grupo AD.

Muitos estudos medem o desempenho simplesmente antes e após um período de treinamento intenso e a falta de testes durante o período de treinamento faz com que as informações sobre as alterações em marcadores biológicos relacionados com o desempenho fiquem incompletas (HALSON, JENKENDRUP 2004). Os resultados apresentados na Figura 4 mostram como se encontrava o desempenho dos grupos de ratos utilizados nas análises sanguíneas da razão glutamina/glutamato no momento da coleta do sangue. Observa-se que os ratos que foram sacrificados após o teste 3 (T2X), apresentaram um nível de desempenho similar aos grupos AD e BD avaliados no mesmo período (teste 3). Isto demonstra que durante o processo de treinamento com uma sessão diária de exercícios todos os ratos estavam se adaptando ao estímulo de forma parecida. Dessa forma, como não é possível realizar uma análise pareada dos marcadores sanguíneos ao longo do treinamento utilizando o desempenho como parâmetro, podemos assumir que os grupos AD e BD estão representados nas análises sanguíneas em três momentos: início do treinamento (CO), alto desempenho (após T2X) e BD ou AD (após T4X).

Muitos indicadores sanguíneos têm sido apresentados na busca de possíveis alterações em estudos do overreaching, overtraining ou overtraining (PETIBOIS, 2002).

Nesse sentido, Halson et al. (2003) reportaram uma diminuição na razão Gm/Ga (glutamina/glutamato) após um protocolo de treinamento intenso em humanos sugerindo uma classificação do overreaching baseada nessa razão. Smith and Norris (2000) também sugeriram que a relação Glutamina/Glutamato (Gm/Ga) pode ser utilizada como um marcador geral de tolerância ao treinamento. Segundo esses autores, atletas com desempenho dentro do esperado apresentariam uma razão Gm/Ga entre 3.58 - 5.88 e atletas em overreaching valores abaixo de 3.58.

No presente estudo, os ratos dos grupos T e AD apresentaram uma razão Gm/Ga maior (4.5 ± 1.7 e 4.5 ± 0.9) do que os grupos CO e BD (2.8 ± 0.5 e 3.1 ± 0.2), apresentando um comportamento similar ao efeito do treinamento intenso em seres humanos. Esses resultados reforçam os resultados de desempenho observados.

Não podemos afirmar que um estado complexo como overtraining pode ser induzido em animais, visto que não se sabe ao certo se a atividade física é condição necessária ou suficiente para a apresentação não apenas da queda de desempenho, mas também para a manifestação de distúrbios psicológicos e comportamentais. No entanto, acreditamos que estudos mais controlados em modelo animal podem auxiliar na definição mais objetiva dos mecanismos causadores da queda de desempenho ocasionados exclusivamente pelo desequilíbrio entre o exercício e o tempo de recuperação.

PERSPECTIVAS

O protocolo de treinamento proposto neste trabalho mostra-se um método controlado de indução ao overreaching ou overtraining de curta duração diagnosticado através da queda de desempenho. Com este modelo é possível se estabelecer uma relação mais precisa entre queda de desempenho, fases do treinamento, perda de massa e biomarcadores, abrindo assim boas possibilidades de investigação.

5 REFERÊNCIAS

ADOLPH, E. F. Perspectives of adaptation: some general properties. In DILL, D. B.; ADOLPH, E. F.; WILBER, C. G. (orgs). **Handbook of physiology**, section 4. Washington: American Physiological Society, 1964.

ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. **Med. Sci. Sports Exerc**, v. 25, p. 218-224, 1993.

ALEXANDER, R. M. Models and the scaling of energy costs for locomotion. **J Exp Biol**, v. 208, p. 1645-1652, 2005.

ALMEIDA, S. A. et al. Epidemiological patterns of musculoskeletal injuries and physical training. **Med. Sci. Sports Exerc**, v. 31, p. 1176-1182, 1999.

ARMSTRONG, L.E; VANHEEST, J.L. The Unknown mechanism of the overtraining syndrome. **Sports Med**, v. 32, n. 3, p. 185-209, 2002.

BARRON, J.L; NOAKES, T.D; LEVY, W. Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 60, p. 803-806, 1985.

BOMPA, T. O. **Periodização: teoria e metodologia do treinamento**. São Paulo: Phorte, 2001.

BRUIN, G. et al. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. **J. Appl. Physiol**, v. 76, n. 5, p. 1908-1913, 1994.

BUDGETT, R. et al. Redefining the overtraining syndrome as the unexplained underperformance syndrome. **Br J Sports Med**, v. 34, p. 67-68, 2000.

CARLILE, F. **Forbes Carlile on Swimming**. Pelham Books: London, 1963.

COSTILL, D. L.; et al. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 20, n. 3, p. 249-254, 1988.

DAVIES, K.J et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem. Biophys. Res. Com**, v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982.

EICHER ER. Overtraining: consequences and prevention. **J Sports Sci**, v. 13, p. 41-48, 1995.

- ESSIG, D. A., NOSEK, T. M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? **Can. J. Appl. Physiol**, v. 22, n. 5, p. 409-428, 1997.
- FELLMAN N; BEDU M; BONDET G. Inter-relationships between pituitary and catecholamines during a 6-day Nordic ski race. **Eur J Appl Physiol**, v. 64, p. 258-265, 1992.
- FITZGERALD L. Overtraining increased the susceptibility to infection. **Int J Sports Med** v.12, n. 1, p. 5-8, 1991.
- FROEHLICH J. Overtraining syndrome. Inc Heil J, editor. **Psychology of sport injury**. Champaign (IL): Human Kinetics, 1995, p. 59-70.
- FRY, A.C; KRAEMER, W.J. Resistance exercise overtraining and overreaching. **Sports Med**, v. 23, p. 106-129, 1997.
- FRY, A.C; KRAMER, W.J; VAN BORSELEN, F. Catecholamine responses to short-term high-intensity resistance exercise overtraining. **J Appl Physiol**, v. 77, p. 941-946, 1994.
- FRY, R. W., MORTON, A. R.; KEAST, D. Periodisation of training stress - a review. **Can. J. Sports Sci**, v. 17, n. 3, p. 234-240, 1992.
- FRY, R.W; NORTON, A.R; KEAST, D. Overtraining in athletes: an update. **Sports Med**, v. 12, p. 32-65, 1991.
- HALSON, L.H; JENKENDRUP, A.E. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. **Sports Med**, v. 34, p. 967-981, 2004.
- HALSON, S.L et al. Immunological responses to overreaching in cyclists. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 5, p. 854-861, 2003.
- JEUKENDRUP, A.E; HESSELINK, M.K; SNYDER, A.C. Physiological changes in male competitive cyclists after two weeks of intensifield training. **Int J Sports Med**, v. 13, n. 7, p. 534-541, 1992.
- Jl, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc**. v. 25, n. 2, 225-231, 1993.
- Jl, L.L. Increasing healthy life span: conventional measures and slowing the innate aging process. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 959, p. 82-92, 2002.
- KARPOVICH, P.; SINNING, W. **Physiology of Muscular Activity**. Saunders: Philadelphia, 1971.
- KREIDER, R.; FRY, A. C.; O'TOOLE, M. Overtraining in sports: terms, definitions and prevalence. In: **Overtraining in sports**. Champaign: Human Kinetics, 1998, p. vii-ix.

- KREIZER, H.A. Neuroendocrine aspects of overtraining In: **Overtraining in sports**. Champaign, IL, Human Kinetics, 1998, p. 145-167.
- KUIPERS, H; KEIZER, H.A. Overtraining in elite athletes: review and directions for the future. **Sports Med**, v. 6, p. 79-92, 1988.
- KUIPERS H. Training and overtraining: an introduction. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, p.1137-1139, 1998.
- LEHMANN, M; FOSTER, C; KEUL, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 25, n. 7, p. 854-862, 1993.
- LEHMANN, M. et al. Automatic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. **Med. Sci. Sports Exerc**, v. 30, n. 7, p. 1140 – 1148, 1998.
- LIU, J. et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol**, v. 89, p. 21-28, 2000.
- LUND, P. Glutamine: UV-method with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**, Vol VIII, Metabolites 3: Lipids, Amino Acids and related Compounds. B. Hu (Ed.) Weinheim: VCF, 1985, p. 357-363.
- MACKENZIE, R. T. **Exercise in Education and Medicine**. London: Saunders, 1923.
- MACKINNON, L.T. Effects of overreaching and overtraining on immune function. In: **Overtraining in sports**. Champaign, IL, Human Kinetics, 1998 p. 219-241.
- MCGIVAN, J.D; PASTOR-ANGLADA, M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. **Biochem J**, v. 229, p. 321-334, 1994.
- MCNAIR, D.; LORR, M. M.; DROPPLEMAN, L. F. **Profile of mood states manual**. San Diego (CA), 1992.
- MEEUSEN, R. et al. Hormonal responses in athletes: the use of a two bout exercise protocol to detect subtle differences in (over)training status. **Eur J Appl Physiol**, v. 91, p. 140-146, 2004.
- NEWSHOLME, et al. A biochemical mechanism to explain some characteristics of overtraining. In: **Advances in nutrition and sports**, F. Brouns (editor). Basel: karger. p.79-83, 1991
- NIEMAN, D.C. Effects of athletic endurance training on infection rates and immunity. In: **Overtraining in sports**. Champaign, IL, Human Kinetics, 1998 p. 193-217.
- NOAKES, T. D. **Lore of running**. South Africa: Human Kinetics, 2001.
- OGONOVSKY, H. et al. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers, DNA repair, and memory in rat brain. **Neurochem Int**, v. 46, n. 8, p. 635-

640, 2005.

OGONOVSKY, H. et al. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. **Can J Appl Physiol**, v. 30, n. 2, p. 186-195, 2005.

PARRY-BILLINGS, M. et al. Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. **Med Sci Sports Exerc**, v. 24, n.12, p. 1353-1358, 1992.

PERRY, J. D. Exercise, injury and chronic inflammatory lesions. **Br Med Bull**. v. 48, p. 668-682, 1992.

PETIBOIS, C. et al. Biochemical Aspects of Overtraining in Endurance Sports. **Sports Med**, v. 32, n. 13, p. 867-878, 2002.

PLATEN, P. Overtraining and the Endocrine System—Part 1: Terminology. **Eur. J. Sport Sci**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2002a.

PLATEN, P. Overtraining and the Endocrine System—Part 2: Review of the Scientific Studies. **Eur. J. Sport Sci**, v. 2, n.1, p. 8-54, 2002b.

POWERS, S. K et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol**, v. 266, p. R-375 –R380, 1994.

REID, M. B. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **J. Appl. Physiol**, v. 90, p. 724-731, 2001.

SHEPHERD, R. J., SHEK, P. N. Acute and chronic over-exertion: do depressed immune responses provide useful markers? **Int. J. Sports Med**, v. 19, p. 159-171, 1998.

SMITH, D.J; NORRIS, S.R. Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 3, p. 684-689, 2000.

SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 2, p. 317-331, 2000.

SMOLKA, M. B. et al. HSP72 as a complementary protection against exercise induced stress in the muscle of rats. **Am. J. Physiol**, v. 279, p. R1539-R1545, 2000.

SNYDER, A. C. Overtraining and glycogen hypothesis. **Med Sci Sports Exerc**. v. 30, p. 1146-1150, 1998.

STONE, M.H et al. Overtraining: a review of the signs, symptoms and possible causes. **J. Appl Sport Sci Res**, v. 5, p. 35-50, 1991.

TIIDUS, P.M. Radical species in inflammation and overtraining. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 76, p. 533-538, 1998.

TURINSKY, J., GONNERMAN, W.A. Temporal alteration of intracellular Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} and PO_4^{3-} in muscle beneath the burn wound. **J Surg Res**, v. 33, p. 337-344, 1982.

URHAUSEN, A; KINDERMANN, W. Diagnosis of overtraining: what tools do we have? **Sports Med**, v. 32, n. 2, p. 95-102, 2002.

URHAUSEN, A; GABRIEL, H; KINDERMANN, W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. **Sports Med**, v. 20, p. 251-276, 1995.

URHAUSEN, A; GABRIEL, H; KINDERMANN, W. Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes. **Med Sci Sports Exer**, v. 30, p. 407-414, 1998.

VAN BORSELEN, F; VOS, N.H; FRY, A.C. The role of anaerobic exercise in overtraining. **J Strength Cond Res**, v.14, p. 74-79, 1992.

VASSILAKOPOULOS, T. et al. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. **J. Appl. Physiol**, v. 94, p. 1025-1032, 2003.

VIRU, A. The mechanism of training effects: a hypothesis. **Int J Sports Med**, v. 5, p. 219-227, 1984.

WELCH, W. J. How cells respond to stress. **Scient Am**, v. 268, n. 5, p. 34-41, 1993.

ZOPPI, C.C; MACEDO, D.V. Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. **Scand J Med Sci Sports**, 2007. (*In Press*)

ZOPPI, C. C. et al. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev. Paul. Educ. Fís**, v.17, n. 2, p. 119-130, 2003.