

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

CAIO VICTOR COUTINHO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA  
PREVENÇÃO DO ESTADO DE *OVERTRAINING* EM RATOS WISTAR:  
ASPECTOS BIOQUÍMICOS, HORMONAIS E MOLECULARES**

JOÃO PESSOA - PB

2013

CAIO VICTOR COUTINHO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA  
PREVENÇÃO DO ESTADO DE *OVERTRAINING* EM RATOS *WISTAR*:  
ASPECTOS BIOQUÍMICOS, HORMONAIIS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.  
Área de Concentração: Ciências da Nutrição

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva

JOÃO PESSOA - PB  
2013

CAIO VICTOR COUTINHO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA PREVENÇÃO DO  
ESTADO DE *OVERTRAINING* EM RATOS *WISTAR*: ASPECTOS BIOQUÍMICOS,  
HORMONAIS E MOLECULARES**

Dissertação \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_/\_\_\_\_/ 2013

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva  
Coordenador da Banca Examinadora  
(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição)

---

Prof. Dr. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves  
Examinador Interno - Titular  
(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição)

---

Prof. Dr. Maria José de Carvalho Costa  
Examinador Interno - Suplente  
(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição)

---

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo  
Examinador Externo - Titular  
(USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Programa de Pós-Graduação Interunidade em  
Nutrição Humana Aplicada)

---

Prof. Dr. Marcos Antonio Pereira dos Santos  
Examinador Externo - Suplente  
(UFPI/Departamento de Biofísica e Fisiologia)

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe e irmão, por ter dado a base para o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional, sempre me apoiando em meus projetos.

À minha namorada e companheira, Danyelle Almeida de Andrade, por ter tido paciência e ter me ajudado em todos os momentos que necessitei durante toda nossa trajetória.

Ao professor, amigo e orientador Dr. Alexandre Sérgio Silva, pela orientação, autonomia, estímulo e confiança depositados para a consecução do presente trabalho desde a elaboração do projeto até a sua conclusão.

À professora Dra. Simone Bezerra Alves pela ajuda no manejo com os animais e pelos ensinamentos nas técnicas de sacrifício.

À professora Dra. Jailane de Souza Aquino pela colaboração e confiança para realização do trabalho no Laboratório de Nutrição Experimental: foi de fundamental importância.

À professora Dra. Edilamar Menezes de Oliveira pela colaboração e disponibilidade no tocante às análises moleculares. Sua participação enriqueceu muito o presente trabalho.

Ao funcionário do biotério do Centro de Biotecnologia (CBiotec), Crispim, pela imensurável orientação, atenção e colaboração no trato dos animais.

À equipe formada, de maneira inusitada até, e seu papel nas diversas tarefas envolvidas com os animais: treinamento, limpeza, sacrifício. Reabias, Gustavo, Carlos, Nayara, Larissa, Claudiane, Camila, Renata, Leandro, Keli e Dany: vocês foram de extrema importância. Sem sua participação, simplesmente essa pesquisa não teria viabilidade. Serei sempre grato.

Aos meus animais, ratos de laboratório: não agradeço, peço perdão.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição - UFPB que contribuíram decisivamente para a minha formação acadêmica e profissional.

A todos os colegas do LETFADS, com os quais tive ótimos momentos de amizade e aprendizado, apesar do curto tempo de convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para eu finalizar o trabalho, e com certeza não foram esquecidos, apenas é impossível citar todos os nomes neste momento.

“Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação”.

*Carl Sagan*

## RESUMO

Os efeitos ergonômicos da suplementação de carboidratos no contexto esportivo são bem aceitos e evidenciados na literatura. Estes efeitos foram demonstrados em diversas modalidades e condições de exercício, sendo capazes de melhorar aspectos bioquímicos, hormonais, inflamatórios e de estresse oxidativo relacionados à prática de atividade física. No entanto, ainda não foi elucidado se esse potencial ergogênico pode ser replicado em condições de exercícios extenuantes e crônicos, como no caso do *overtraining* (OT). Assim, este estudo objetivou verificar se a suplementação de carboidratos é capaz de prevenir e/ou minimizar os efeitos deletérios de um protocolo de exercícios destinado a induzir OT em ratos Wistar machos adultos. Os animais (n=32) foram divididos aleatoriamente em grupo controle (C) (n=9), exercício sem suplementação (EX) (n=10) e exercício com suplementação de carboidratos (EX-CHO) (n=13) e submetidos a 11 semanas de treinamento de corrida em esteira, sendo as 3 últimas semanas destinadas a induzir o estado de OT. Testes de performance (Pr) foram realizados antes da 1ª semana (Pr1) e ao término da 8ª (Pr2) e 11ª (Pr3). Após 36h do último teste, os animais foram sacrificados. Níveis de testosterona, cortisol, Malondialdeído (MDA) e Creatina Kinase (CK) foram dosados. A atividade da PI3-K, Akt-1, mTOR e GSK-3 foram mensuradas no gastrocnêmio. Peso ponderal e consumo alimentar foram monitorados semanalmente. O protocolo de treinamento foi eficaz em promover redução da capacidade de desempenho no momento Pr3 em relação ao Pr2 (decréscimo de 36% em EX,  $p < 0,05$ ), mas esta redução só foi significativa no grupo que não ingeriu carboidratos. Estes animais do grupo EX apresentaram redução do consumo alimentar na 11ª semana em relação a C ( $17,07 \pm 0,2$ g/dia vs  $26,31 \pm 3,6$ g/dia, respectivamente,  $p < 0,001$ ), sendo que EX-CHO manteve a mesma ingestão (de  $18,62 \pm 5,4$ g/dia de EX-CHO vs  $26,31 \pm 3,6$ g/dia de C,  $p > 0,05$ ). Adicionalmente, EX-CHO terminou o protocolo com peso corrigido do músculo gastrocnêmio maior que C ( $5,39 \pm 0,48$ g vs  $4,89 \pm 0,27$ g respectivamente,  $p = 0,02$ ), sem que o mesmo tenha ocorrido em EX. O protocolo de treinamento promoveu diminuição da testosterona ( $p = 0,001$ ) e elevação de MDA ( $p = 0,009$ ) nos dois grupos exercício em relação a C, sem que a suplementação de carboidratos tenha influenciado estas variáveis ( $p > 0,05$ ). Enquanto isso, níveis de CK e cortisol não se elevaram nos dois grupos exercício em relação ao grupo C. Considerando os ensaios moleculares, a atividade da Akt-1 apresentou-se maior apenas em EX-CHO comparado a C ( $p = 0,013$ ), enquanto que a da mTOR não apresentou diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que a suplementação de carboidratos promove discreta atenuação na queda da performance, inibição da anorexia e aumento da massa muscular em animais submetidos a protocolo de OT. Este ganho muscular foi acompanhado pela maior atividade do sinalizador molecular anabólico e anti-catabólico Akt-1. Por outro lado, não preveniu alterações nos marcadores de OT estresse oxidativo, perfil hormonal e dano muscular.

**Palavras-chave:** Carboidrato, Performance, Overtraining, Akt-1

## ABSTRACT

The ergogenic effects of carbohydrate supplementation in the sporting context are well accepted and documented in the literature. These effects have been demonstrated in various modalities and conditions of exercise, being able to improve the biochemical, hormonal, inflammatory and oxidative stress-related to physical activity. However, it has not yet been elucidated whether this ergogenic potential can be replicated under conditions of chronic and strenuous exercise, as in the case of overtraining (OT). Thus, this study aimed to verify whether carbohydrate supplementation is able to prevent and/or minimize the deleterious effects of an exercise protocol to induce OT in adult male Wistar rats. The animals (n = 32) were randomly divided into control group (C) (n = 9), exercise without supplementation (EX) (n = 10) and exercise with carbohydrate supplementation (EX-CHO) (n = 13) and underwent 11 weeks of treadmill training running, being the last 3 weeks aimed to induce the state of OT. Performance tests (Pr) were performed before the 1st week (Pr1) and at the end of the 8th (Pr2) and 11th (Pr3). Thirty-six hours after the last test, the animals were sacrificed. Levels of testosterone, cortisol, Malondialdehyde (MDA) and Creatine Kinase (CK) were measured. The activity of PI3-K, Akt-1, mTOR and GSK-3 were measured in the gastrocnemius. Weight and food consumption were monitored weekly. The training protocol was effective in causing decrement of performance when comparing Pr3 to Pr2 (decrease of 36% in EX,  $p > 0.05$ ), but this reduction was not significant in the group who ingested carbohydrates. These animals of EX group showed a reduction in food intake in week 11 compared to C ( $17.07 \pm 0.2$  g/day vs.  $26.31 \pm 3.6$  g/day, respectively,  $p < 0.001$ ), but EX-CHO kept the same intake ( $18.62 \pm 5.4$  g/day in EX-CHO vs.  $26.31 \pm 3.6$  g/day in C,  $p > 0.05$ ). Additionally, EX-CHO finished the protocol with corrected gastrocnemius muscle weight greater than C ( $5.39 \pm 0.48$  g vs.  $4.89 \pm 0.27$  g, respectively,  $p = 0.02$ ), the same has not occurred in EX. The training protocol promoted decrease in testosterone ( $p = 0.001$ ) and elevation of MDA ( $p = 0.009$ ) in both exercise groups compared to C, without influence of supplemented carbohydrates in these variables ( $p > 0.05$ ). Meanwhile, CK and cortisol levels did not increase in both exercise groups compared to C. Considering the molecular assays, the activity of Akt-1 was higher only in EX-CHO compared to C ( $p = 0.013$ ), whereas mTOR showed no differences between the groups ( $p > 0.05$ ). We conclude that carbohydrate supplementation promotes slight attenuation in performance decrement, inhibition of anorexia and increase muscle mass in animals subjected to OT protocol. This muscle gain was accompanied by greater activity of anabolic and anti-catabolic molecular signaling Akt-1. On the other hand, it did not prevent changes in markers of OT oxidative stress, hormonal profile and muscle damage.

**Key-words:** Carbohydrate, Performance, Overtraining, *Akt-1*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

<b>Tabela 1 -</b>	Protocolo de Treinamento.....	34
-------------------	-------------------------------	----

### LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

<b>Figura 1 -</b>	Causa e alterações da Síndrome de Overtraining.....	15
<b>Figura 2 -</b>	Teoria das Citocinas.....	23
<b>Figura 3 -</b>	Fluxograma dos testes de <i>performance</i> e semanas de treinamento do protocolo de indução de OT.....	33

### LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

<b>Tabela 1 -</b>	Protocolo de Treinamento.....	75
<b>Tabela 2 -</b>	Peso dos Animais e Órgãos e Gordura Peritoneal.....	76
<b>Tabela 3 -</b>	Análises sanguíneas.....	77

### LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

<b>Figura 1 -</b>	Fluxograma dos testes de <i>performance</i> e semanas de treinamento do protocolo de indução de OT.....	78
<b>Figura 2 -</b>	<i>Performance</i> de C, EX e EX-CHO nos três Pr.....	79
<b>Figura 3 -</b>	Consumo Alimentar em C, EX e EX-CHO nas semanas do protocolo experimental.....	80
<b>Figura 4 -</b>	Atividade proteica de GS, PI3K, Akt1 e mTOR em C, EX e EX-CHO.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico  
Akt – Proteína Kinase B  
ANOVA – Análise de Variância  
C – Grupo controle sedentário  
CBiotec – Centro de Biotecnologia  
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais  
CK – Creatina Kinase  
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
DMIT – Dor Muscular de Início Tardio  
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio  
EX – Grupo exercício sem suplementação  
EX-CHO – Grupo exercício com suplementação de carboidratos  
FC – Frequência Cardíaca  
GH – Hormônio do Crescimento  
GSK-3 – Glicogênio Sintase Quinase 3  
IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 - Beta  
IL-6 – Interleucina 6  
ITRS – Infecção do Trato Respiratório Superior  
LDH – Lactado Desidrogenase  
LETFADS – Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e Saúde  
mTOR – Mammalian Target of Rapamycin  
MDA - Malondialdeído  
MTA – Microtrauma Tecidual Adaptativo  
NOR – *Overreaching* não funcional  
OR - *Overreaching*  
OT - *Overtraining*  
PA – Pressão Arterial  
PI3 K – Fosfatidil Inositol 3 kinase  
Pr – teste de performance  
Pr1 – teste de *performance* 1  
Pr2– teste de *performance* 2  
Pr3– teste de *performance* 3  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SOT – Síndrome de *Overtraining*  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa  
T1 - Fase de Treinamento 1  
T2 - Fase de Treinamento 2  
T3 - Fase de Treinamento 3  
UFPB – Universidade Federal da Paraíba

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Prevalência e definição de <i>overtraining</i> .....	14
2.2 Etiologia e mecanismos envolvidos no <i>overtraining</i> .....	17
2.3 Participação da nutrição nas adaptações ao treinamento e prevenção do <i>overtraining</i> .....	23
2.4 Suplementação de carboidratos para retardar fadiga e acelerar recuperação: capacidade de prevenir <i>overtraining</i> ?.....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 Animais .....	32
3.2 Desenho experimental.....	32
3.3 Protocolo de adaptação.....	33
3.4 Protocolo de treinamento.....	34
3.5 Testes de <i>performance</i> .....	34
3.6 Protocolo de suplementação.....	35
3.7 Consumo alimentar.....	36
3.8 Avaliação da massa corpórea e controle do consumo de ração.....	36
3.9 Sacrifício dos animais.....	36
3.10 Coletas sanguíneas.....	36
3.10.1 <i>Creatina Kinase (CK)</i> .....	37
3.10.2 <i>Malondialdeído (MDA)</i> .....	37
3.10.3 <i>Testosterona e cortisol</i> .....	37
3.11 Expressão protéica de GSK- 3, PI3- k, Akt-1, mTOR.....	37
3.12 Análise estatística.....	38
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	50
<b>ARTIGO</b> .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

A síndrome de *overtraining* (SOT) é fenômeno cuja prevalência tem aumentado entre atletas de alto rendimento (LEHMANN et al., 1998; SMITH, 2000). Estima-se que os sintomas de SOT já chegaram a atingir, em algum momento da carreira profissional, 37% de atletas de elite de diversas modalidades (KENTTÄ; HASSMÉN; RAGLIN, 2001), 65% dos corredores de longa distância (MORGAN; BROWN, 1987), 50% dos jogadores de futebol semi-profissional e 21% dos nadadores da equipe nacional australiana (SMITH, 2000).

É caracterizada por uma diminuição de desempenho (SMITH, 2000; CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006; MEEUSEN et al., 2006), podendo perdurar por semanas ou até meses, mesmo após descanso (URHAUSEN; KINDERMANN, 2002). Isto é resultante de um desbalanço entre um excesso de treinamento com inadequada recuperação e/ou nutrição (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002; ROGERO; MENDES; TIRAPEGUI, 2005; ACKEL-D'ELIA et al., 2010). Fisiologicamente ocorrem perturbações bioquímicas, imunológicas, hormonais e psicológicas sem, entretanto, apresentar um único fator causal (MEEUSEN et al., 2006; MARGONIS et al., 2007; TANSKANEN; ATALAY; UUSITALO, 2010; ACKEL-D'ELIA et al., 2010).

Considerando que a alimentação é fator importante na etiologia do *overtraining* (OT), seu principal aspecto relacionado à prática de exercícios é a capacidade dos nutrientes de promover efeitos ergogênicos capazes de acelerar a recuperação entre as sessões de treinamento (KREIDER et al., 2010). Neste sentido, a utilização de recursos nutricionais com esta finalidade ergogênica tem crescido consideravelmente (SOBAL; MARQUART, 1994; CARVALHO; RODRIGUES; MEYER, 2003).

Embora a real necessidade da suplementação nutricional seja tema controverso na literatura atual, o valor ergogênico da suplementação de carboidratos é reconhecido pela maioria dos pesquisadores como eficaz em retardar a fadiga em exercícios de resistência (ANANTARAMAN et al., 1995; TSINTZAS; WILLIAMS, 1998), aumentar a taxa de ressíntese de glicogênio (VAN LOON et al., 2000) além de restaurar a capacidade física mais rapidamente (ANANTARAMAN et al., 1995). Este retardo da fadiga também foi confirmado em várias condições específicas, como em exercícios aeróbicos realizados sob calor (CARTER et al., 2003; BAILEY et al., 2008), no retardo da fadiga central (KREIDER et al., 1995; WELSH et al., 2002), na recuperação após a sessão de treinamento, bem como elevação

da insulinemia durante os exercícios (ANDREWS et al., 2003). Portanto existe consenso de que os carboidratos tem capacidade ergogênica no exercício físico.

Sendo os carboidratos capazes de acelerar a recuperação pós-exercício, este fenômeno suporta as bases para sustentar a hipótese de que várias sessões de treinamento intenso seguidas deste estímulo à recuperação minimizaria ou evitaria o desenvolvimento do processo de OT. No entanto, até o momento não é possível atribuir aos carboidratos o que seria esta nova capacidade ergogênica de prevenir o OT. Isto não é possível porque os estudos que mostram mais rápida recuperação pós- exercício foram feitos com base em uma única ou poucas sessões (SCHUMM et al., 2008).

Além disso, os trabalhos existentes são restritos à síntese proteica muscular, ressíntese de glicogênio, aumento de desempenho e marcadores de catabolismo proteico bem como de estresse oxidativo em resposta a diferentes formas de suplementação e protocolos de exercício, não sendo contemplados vários dos marcadores importantes relacionados ao OT (VAN LOON et al., 2000; CLOSE; ASHTON; CABLE, 2006; BATY et al., 2007; KREIDER et al., 2007; MORIFUJI et al., 2010, 2011). Até o presente momento, poucos estudos investigaram o efeito ergogênico do carboidrato na prevenção do OT, em ciclistas, corredores e atletas de *badminton* (SNYDER et al., 1995; HALSON et al., 2004; FAHLSTRÖM et al., 2006). No entanto, vários aspectos relevantes, como os moleculares, não foram explorados nestes trabalhos. Apenas fatores fisiológicos (frequência cardíaca), psicológicos, de ansiedade, antropométricos e hematológicos (hemoglobina e cortisol) foram contemplados.

Como objetivo geral propõe-se investigar o efeito da suplementação de carboidratos na prevenção do estado de OT em ratos Wistar. Como objetivos específicos:

- Analisar os efeitos da suplementação de carboidratos na proteólise por meio da dosagem de Creatina Kinase (CK) ao final do protocolo de treinamento de OT;
- Avaliar o efeito da suplementação de carboidratos no peso ponderal dos animais, do músculo gastrocnêmio, coração e timo.
- Investigar os efeitos da suplementação de carboidratos na atividade proteica das enzimas Glicogênio Sintase Quinase 3 (GSK-3), Fosfatidilinositol 3 Quinase (PI3 K), Proteína Kinase B (Akt) e *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) ao final do protocolo de treinamento de OT;
- Examinar os efeitos da suplementação na atividade hormonal catabólica de cortisol ao final do protocolo de treinamento de OT;

- Avaliar os efeitos da suplementação na atividade anabólica da testosterona ao final do protocolo de treinamento de OT;
- Analisar os efeitos das diferentes suplementações no estresse oxidativo ao final do protocolo de treinamento de OT através da mensuração de Malondialdeído (MDA).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PREVALÊNCIA E DEFINIÇÃO DE *OVERTRAINING*

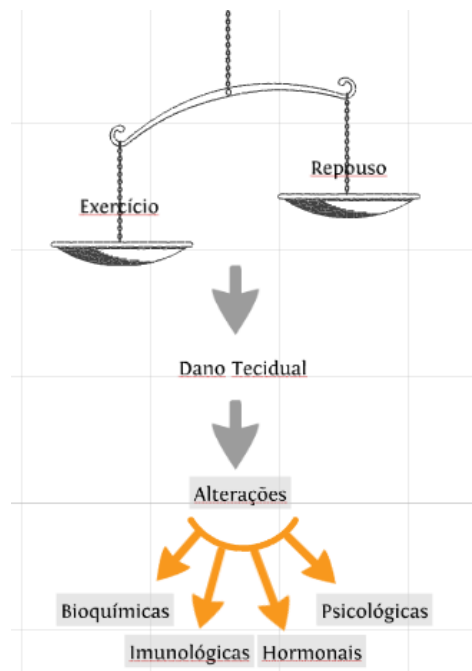
A SOT representa uma das complicações mais temidas por atletas de competição e é um assunto de relevante interesse investigativo da ciência relacionada ao esporte (HALSON et al., 2003). A SOT é hoje definida como um quadro crônico de sensação de fadiga e queda de desempenho que pode persistir por semanas ou meses (PEREIRA et al., 2012; FERRARESSO et al., 2012; XIAO; CHEN; DONG, 2012).

A importância da compreensão da prevalência da SOT foi primeiramente demonstrada por Gould et al. (1998) na Olimpíada de Atlanta, 1996. O estudo, que compreendeu 296 atletas de 30 diferentes modalidades, mostrou que 84 (28%) apresentaram OT e que este tinha relação com a queda de desempenho. A prevalência do OT no esporte parece variar de acordo com a modalidade em questão. Esportes que envolvem grandes volumes de treinamento frequentemente demonstram maior número de resultados positivos, como as modalidades de corridas (60%) (MORGAN et al., 1987, 1988) e natação (20%) (HOOPER et al., 1993). Em esportes coletivos, observou-se 33% em atletas de basquete (VERMA; MAHINDROO; KANSAL, 1978) e 50% em atletas de futebol (LEHMANN et al., 1992).

Embora mais frequentemente seja notado em atletas de elite, o OT é também um problema em outros níveis de participação. Em corredoras amadoras, cerca de 33% apresentaram OT em algum momento de suas vidas (MORGAN et al., 1987). Raglin e Wilson (2000) sugeriram que jovens atletas acometidos pelo OT, resultante do volume de exercícios, e com resultados negativos no treinamento, são particularmente submetidos a carga de treinamento comparável à dos atletas adultos e de elite. No único estudo publicado com esta parcela da população, 35% da amostra de nadadores de diferentes países (com idade variando entre 13 e 18 anos) tiveram OT pelo menos uma vez em suas vidas, concluindo que a prevalência em jovens atletas foi similar à encontrada entre os atletas adultos e de *endurance* (RAGLIN et al., 2000).

A SOT é caracterizada por um excesso de treinamento com inadequada recuperação e/ou nutrição (figura 1) (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002; ROGERO; MENDES; TIRAPÉGUI, 2005), que tem como principal desfecho uma significativa queda do desempenho esportivo (SMITH, 2000; CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006; MEEUSEN et

al., 2006), mesmo após um período de recuperação apropriado (PLATEN, 2002). A redução do desempenho é acompanhada por perturbações bioquímicas, imunológicas, hormonais e psicológicas sem, entretanto, apresentar um único fator causal nem uma ferramenta diagnóstica única e definitiva (OGONOVSKY et al., 2005; MEEUSEN et al., 2006, 2007; MARGONIS et al., 2007; ACKEL-D'ELIA et al., 2010a; TANSKANEN; ATALAY; UUSITALO, 2010).



**Figura 1** – Causa e alterações da Síndrome de Overtraining. Fonte: dados próprios

Segundo Meeusen et al. (2006), Roose e Vries (2009) e Slivka et al. (2010), o estado de OT pode ser considerado como um processo contínuo de intensificação do exercício, iniciado por curto período de *overreaching (functional overreaching)* - OR, passando por *overreaching não funcional (nonfunctional overreaching)* - NOR até a SOT. No entanto, como afirmam Halson e Jeukendrup (2004), não há evidência científica que confirme que o estado de OR necessariamente irá evoluir a OT, nem que os sintomas deste último sejam piores que o primeiro.

O estado denominado *overreaching (functional overreaching)* consiste no declínio da *performance* por curto período, seguido pela supercompensação (MEEUSEN et al., 2006; HOHL et al., 2009). Decorrente disto, muitos técnicos entendem que é necessário induzir este estado durante o processo de treinamento (URHAUSEN; KINDERMANN, 2002). Neste processo, os períodos de recuperação entre uma sessão de treinamento e outra são

controlados, a fim de se atingir o período de supercompensação apenas em momentos específicos, como no final de uma temporada de treinamento ou previamente a um evento competitivo específico (ROGERO; MENDES; TIRAPEGUI, 2005).

Como aborda Coutts et al. (2007), avanços no estudo da SOT tem sido limitados decorrente da grande variabilidade nos desenhos metodológicos empregados e da carência de voluntários que estejam dispostos a correr o risco de perder uma temporada de treinos/competições. Adicionalmente, experimentos em humanos devem respeitar critérios éticos que protejam o bem-estar físico e emocional dos sujeitos. Assim, a utilização de modelo animal para estudo deste estado é necessário. Neste contexto, a Sociedade Americana de Fisiologia afirma que “protocolos experimentais que se utilizem de animais são desenvolvidos quando não se é apropriado utilizar seres humanos para estudar os efeitos do impacto do exercício físico”. Ainda segundo este órgão, um modelo seria a imitação de um objeto, que não apenas possuiria as mesmas características deste, mas também poderia ser manipulado de maneira tal que o objeto não poderia ser. Dessa maneira, o modelo animal para estudo do OT deve apresentar respostas similares a seres humanos (KREGEL et al., 2006).

Somado a isso, entrave comum em estudar a SOT e suas taxas de prevalência em atletas são as diversas definições associadas aos efeitos negativos consequentes do excesso de treino, uma vez que os termos mais usados muitas vezes não indicam se os indivíduos estão apenas fadigados, em estado de OR ou em OT, podendo ter diferentes significados em diferentes contextos (HARTMANN; MESTER, 2000).

Halson e jeukendrup (2004) elencam ainda mais alguns fatores a considerar acerca dos aspectos metodológicos na pesquisa do OT, podendo-se citar: 1) inexistência de ferramentas diagnósticas “definitivas”, o que resulta no diagnóstico do estado de OR e OT de diferentes maneiras; 2) a quantidade e qualidade do treinamento intensivo nos diversos estudos repetidamente não são não mensuradas e/ou reportadas. Assim, a duração e intensidade do treinamento necessárias para indução do estado de OR / OT é desconhecida; 3) respostas à sobrecarga do treinamento intensificado são bastante individuais, e diferenças podem existir entre modalidades esportivas diversas. Além disso, indivíduos submetidos ao mesmo programa de treinamento intenso podem vir a apresentar diferentes sintomas da SOT; 4) por último, e talvez mais importante, o conhecimento acerca dos marcadores de OT baseiam-se unicamente em estudos que induziram OR em atletas, sendo impossível traçar conclusões sobre as similaridades e/ou diferenças das repercussões metabólicas entre estes estados.

Dessa maneira, a temática do OT como objeto de estudo dentro das ciências do esporte ainda constitui-se como campo pouco explorado e com diversas dificuldades metodológicas que limitam seu avanço. Mais pesquisas são requeridas, havendo a necessidade de maior crivo científico no que se refere principalmente às ferramentas diagnósticas (ex: *performance*) e de indução desse estado (monitoramento das cargas de treino e do período de repouso).

## 2.2 ETIOLOGIA E MECANISMOS ENVOVIDOS NO *OVERTRAINING*

Apesar de existir diversas teorias na atualidade, os reais mecanismos que levam ao desenvolvimento da SOT permanecem ainda em investigação (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002). As pesquisas abordam áreas de fisiologia, bioquímica, nutrição e psicologia, com ênfase no sistema nervoso autônomo e controle hormonal (BARRON; NOAKES; LEVY, 1985; FELLMAN; BEDU; BONDET, 1992; VAN BORSELEN; VOS; FRY, 1992; KEIZER, 1998; MEEUSEN et al., 2004), sistema imune (MACKINNON, 2000), processo inflamatório (SMITH, 2004), depleção de glicogênio (COSTILL; FLYNN; KIRWAN, 1988; SNYDER et al., 1995) e estresse oxidativo (MARGONIS et al., 2007) como desencadeadores de alterações do OT.

A maioria dos trabalhos apresenta poucos resultados provenientes de estudos controlados, decorrente principalmente da dificuldade de se aplicar um treinamento que objetive uma diminuição da capacidade fisiológica funcional (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002) e a falta de atletas voluntários que estejam dispostos a correr o risco de perder uma temporada de treinos/competições (LEHMANN et al., 1998). Dessa forma, muitos dos sujeitos sintomáticos aparecem casualmente entre equipes de atletas, sendo diagnosticados como “*overtreinados*” numa situação retroativa, contribuindo para informações imprecisas e conflitantes (HALSON; JEUKENDRUP, 2004).

Diversas teorias foram desenvolvidas com o intuito de explicar os mecanismos pelos quais o OT se instala (SNYDER et al., 1995; CASTELL; POORTMANS; NEWSHOLME, 1996; KEIZER, 1998; LEHMANN et al., 1998; WALSH et al., 1998). À medida que estudos foram sendo conduzidos, observou-se que estas teorias contemplavam aspectos limitados deste estado, sem, entretanto, perderem sua validade. Assim, notou-se uma grande inconsistência nos achados destes estudos, posto que nenhuma das teorias vigentes conseguia explicar o OT em sua totalidade. Pode-se citar as teorias do desequilíbrio neuro-endócrino,

depleção de glicogênio, redução dos níveis de triptofano e de glutamina como exemplos das tentativas para elucidação dos mecanismos do OT baseadas em aspectos unifatoriais.

No início do século, Smith (2000) propôs uma teoria que abrangia estes diversos aspectos até então considerados unicamente. Decorrente do OT aparentar demonstrar caráter multifatorial, esta autora propôs que um desequilíbrio neuro-endócrino-imunológico seria o mecanismo por detrás de todos os acontecimentos evidentes nesta síndrome. Dessa forma, em uma única teoria, conhecida como teoria das citocinas, todos os mecanismos desencadeadores do OT estariam presentes de maneira concomitante e complementar. Esta é a teoria mais aceita e plausível dos mecanismos da SOT.

*Desequilíbrio neuroendócrino:* Muitas investigações têm mantido o foco sobre o hipotálamo, posto que é o órgão responsável pela modulação do sistema nervoso autônomo e das glândulas adrenais e gonadais (eixos hipotálamo-hipófise adrenal e eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, respectivamente)(DUCLOS; FOSTER; STATES, 2012). Essa função moduladora resulta em alterações nas concentrações plasmáticas das catecolaminas, glicocorticoides e nos níveis de testosterona (SMITH, 2004). Como afirma Keizer (1998), há o envolvimento desses sistemas no OT, uma vez que o treinamento de alta intensidade/volume representa um estresse físico e psicológico extremo.

Durante períodos de treinamento intensos, com recuperação inadequada, a maioria dos achados dão evidências de um incremento da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, gerando um incremento dos níveis de cortisol, o que é geralmente verificado em estágios pré - OT (OR). Posteriormente, à medida que o programa de treinamento físico continua com períodos de descanso insuficientes, ocorre uma diminuição da responsividade adrenal, apesar de um incremento do ACTH, que resulta numa diminuição dos níveis de cortisol. Depois disto, com o OT já instalado, a hipófise também diminui a liberação de ACTH. Neste estágio existem evidências da ocorrência de uma diminuição da atividade simpática intrínseca e da sensibilidade dos órgãos-alvo das catecolaminas (HUG et al., 2003). Isto decorre da constatação da diminuição da excreção de catecolaminas durante o repouso noturno, diminuição da densidade e das respostas mediadas por receptores beta-adrenérgicos, e aumento dos níveis plasmáticos de norepinefrina de repouso e em resposta ao exercício. No entanto, este padrão só é observado após exercício de endurance com alto volume de exercício e demandas energéticas (LEHMANN et al., 1998).

Decorrente desta constatação, alguns autores reforçam a divisão do OT em dois tipos: a forma simpática e a parassimpática. No OT simpático, uma predominância da atividade

simpática é sugerida, com parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) de repouso aumentadas, apetite diminuído, perda de massa corporal, distúrbio do sono e irritabilidade (KELLMANN, 2002). Ao contrário, no OT parassimpático é sugerida uma predominância da atividade parassimpática caracterizada pela queda da FC e PA de repouso, longos períodos de sono e depressão. Ambos os tipos mostram deteriorização no desempenho e fadiga persistente. Segundo Lehmann et al. (1998), é provável que as respostas do OT sigam uma progressão, refletida por uma predominância do simpático seguido pela estimulação parassimpática.

A predominância de OT simpático ou parassimpático guardaria relação com a modalidade praticada, uma vez que exercícios diferentes impõem diferentes estresses metabólico-fisiológicos. O OT simpático seria apontado principalmente em atletas que utilizam potência e velocidade, caso de fisiculturistas e saltadores e corredores velocistas e meio fundistas, ao passo que o OT parassimpático atingiria majoritariamente atletas de endurance, como corredores, ciclistas e nadadores de longa distância. Em casos mais severos e duradouros, o tipo simpático, caracterizado como excitatório, raramente é encontrado ou percebido (LEHMANN; FOSTER; KEUL, 1993). Na literatura, os sintomas de OT relatados em atletas de endurance tendem a refletir, além de características parassimpáticas, aquelas de origem simpática. Ainda assim, há poucas evidências que suportam a classificação da SOT nessas duas apresentações (LEHMANN et al., 1998).

*Depleção de Glicogênio:* atletas de alto rendimento são sujeitos a intensos períodos de competição/treinamento. Essa carga elevada de exercícios demanda uma alta quantidade de energia, proveniente primariamente dos estoques de glicogênio muscular e hepático (BETTS; WILLIAMS, 2010). À medida que a carga de exercícios se torna maior do que a capacidade de ressíntese destes estoques de energia, que pode chegar até 48h com uma alimentação adequada em termos glicídicos (ROGERO; MENDES; TIRAPEGUI, 2005), o indivíduo pode apresentar níveis crônicos de depleção do glicogênio muscular e hepático. A consequência resultante é uma proteólise muscular elevada e consequente redução das respostas adaptativas positivas ao exercício (KREIDER et al., 2010). Depleção de glicogênio ainda resulta num maior estresse metabólico em resposta ao exercício, sendo evidente pelas elevadas concentrações de catecolaminas, cortisol e glucagon (DUCLOS; FOSTER; STATES, 2012). Desse modo, Snyder et al. (1995) hipotetizaram que baixos estoques de glicogênio muscular poderiam ser um provável mecanismo da SOT.

Apesar desta relação entre estoques de glicogênio e fadiga muscular ser bem evidenciada na literatura, existem estudos que demonstraram que atletas apresentaram sintomas de SOT mesmo apresentando níveis adequados de glicogênio (SNYDER et al., 1995; COSTILL; FLYNN; KIRWAN, 1988;). Snyder et al (1995) investigaram o desempenho de atletas em resposta a períodos de intensificação dos treinos, havendo o cuidado do fornecimento adequado de carboidratos. Observaram que mesmo após de 15 dias de treinamento intenso, estando os sujeitos em estado de OR, seus estoques de glicogênio muscular não diferiram daqueles em treinamento adequado. Portanto, tem sido sugerido que outro mecanismo ou a combinação de diversos mecanismos estejam envolvidos no desenvolvimento da SOT.

Redução dos níveis séricos de triptofano: ainda é inconsistente na literatura o papel que certos neurotransmissores, neuromoduladores e receptores celulares tem na etiologia da SOT. No entanto, alguns estudos tem focado no papel da serotonina e do triptofano, seu precursor, e suas possíveis associações com o OT (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002). A serotonina é capaz de induzir diversos efeitos neurovasculares, hormonais e metabólicos no organismo. No Sistema Nervoso, ela tem a capacidade de regular o estado de humor, sono, apetite, função cognitiva e de aprendizagem, memória, ritmo circadiano e função motora (MELTZER, 1990). Estes diversos aspectos podem estar alterados na SOT, sendo associados a alterações nas funções regulatórias do hipotálamo que, como supracitado, regula o sistema nervoso simpático e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DUCLOS; FOSTER; STATES, 2012). Além disso, níveis de serotonina estão envolvidos na regulação de hormônios como prolactina, hormônio do crescimento (GH) e hormônio luteinizante, que estão associados com a resposta ao estresse e função hipotalâmica (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002).

Em atletas com OT, os níveis cerebrais de serotonina guardam associação com os níveis séricos de seu precursor, o triptofano. Este aminoácido em condições de estresse físico exacerbado e crônico, como no OT, apresenta suas concentrações reduzidas por diversos motivos, como: utilizado como substrato para a atividade leucocitária e síntese de proteínas de fase aguda positiva; redução da proteína albumina (uma proteína de fase aguda negativa), sua principal carreadora; e maior ativação da enzima *indoleamina 2,3 dioxigenase* (enzima catabolizadora do triptofano) (SMITH, 2004). Portanto, a redução dos níveis do precursor de serotonina, comum em atletas com a SOT, parece estar associada com várias repercussões evidentes na SOT. Este quadro reflete, principalmente, os diversos relatos de atletas sofrendo

de distúrbios psicológicos, como estado do humor alterado e depressão (MEEUSEN et al., 2007).

Estudos realizados com modelo animal parecem confirmar a hipótese de que a redução da concentração de serotonina no SNC, decorrente da alteração de aminoácidos no plasma, esteja relacionada à fadiga (SMITH, 2000). Entretanto, em humanos, os resultados obtidos são contraditórios, principalmente devido à falta de padronização metodológica, o que impede traçar relação causa-efeito em relação a este fenômeno (ROGERO; MENDES; TIRAPEGUI, 2005).

Níveis Séricos de Glutamina: durante vários estados catabólicos, como infecções, cirurgias, trauma, acidose e exercícios físicos extenuantes e prolongados, a homeostase da glutamina é colocada sob estresse, sendo as reservas musculares (principalmente) depletadas. Nestas situações, sua rota metabólica parece sofrer modificações, tendo maior fluxo para o fígado e rins, participando da neoglicogênese e regulação da acidose, respectivamente, com o intuito de restabelecer as condições homeostáticas (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996). Nesse contexto, a glutaminemia se eleva agudamente, seguida por diminuição no período de recuperação (basal), sendo necessárias algumas horas para que os níveis pré-exercício sejam reestabelecidos (quanto mais extenuante e longo for o exercício, maior o tempo necessário para que isso ocorra). Dessa maneira, em decorrência de suas diversas funções fisiológicas, principalmente àquelas relacionadas à função imune (proliferação linfocitária e função dos macrófagos), suas concentrações tendem a diminuir, comprometendo assim todo o sistema imunológico que já está debilitado na SOT, devido ao estado catabólico já instalado (MACKINNON, 2000).

Castell, Poortmans e Newsholme (1996) verificaram os efeitos da suplementação oral de glutamina sobre a incidência de infecções em atletas. Os atletas estudados eram ultramaratonistas, maratonistas, corredores de média distância e remadores. O grupo placebo recebeu carboidrato (maltodextrina) e o suplementado glutamina (solução contendo 5g diluídos em 350mL de água) imediatamente e 2h após o término da competição ou sessão de treinamento intenso. Questionários foram distribuídos para detectar a ocorrência de infecções durante a semana (7 dias) subsequente à prova. No grupo glutamina, 19% dos atletas reportaram alguma infecção no período, contra 51% do placebo. Embora a incidência de infecção tenha aumentado em ambos os grupos, os autores concluíram que a suplementação de glutamina atenuou o número de casos.

Entretanto, outros ensaios (NIEMAN, 2008) demonstraram pouco ou nenhum efeito benéfico sobre a imunocompetência de indivíduos submetidos a treinamento exaustivo ou exercício intenso e prolongado, sugerindo que a suplementação de glutamina no pós-exercício extenuante exerce pouco efeito sobre a imunocompetência. Um problema na teoria da glutamina é que, apesar de seus níveis plasmáticos serem reduzidos em resposta a uma sessão de exercício extenuante, esta redução ainda não é suficientemente elevada para alterar a função linfocitária, mesmo em ultra-maratonistas (HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

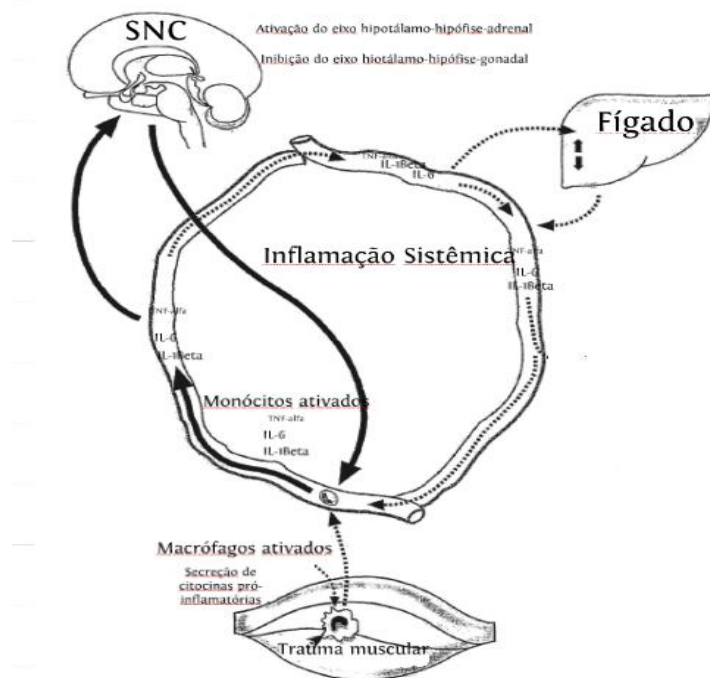
*Teoria das Citocinas:* Apesar de não existir um único fator causal para o desenvolvimento da SOT (HEDELIN et al., 2000; SLIVKA et al., 2010; BRESCIANI et al., 2011), a etiologia mais plausível, embora ainda não consensual, é proposta por Smith (2000). De acordo com este autor, os microtraumas naturalmente ocasionados pelo exercício (microtraumas teciduais adaptativos - MTA) não são devidamente cicatrizados, mesmo com a ação inflamatória aguda e local desencadeada, decorrentes da alta carga e/ou volume de treinamento e curtos períodos de recuperação. À medida que o treinamento com recuperação insuficiente prossegue, há evolução para uma inflamação crônica que por sua vez se transforma em inflamação sistêmica. Parte dessa inflamação sistêmica envolve a ativação dos monócitos circulantes, que podem sintetizar grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ).

Da mesma forma, os MTA gerados pelo exercício induzem a produção de espécies reativas de oxigênio - EROS, causando mais dano muscular (TIIDUS, 1998). Com a presença das EROS, os neutrófilos e monócitos infiltram-se no tecido muscular para recuperá-lo, gerando mais EROS (via *respiratory burst*), bem como mais citocinas que, através de um grande número de mecanismos inter-relacionados, promovem a resposta inflamatória pós-exercício e a remoção do tecido lesado e sua recuperação (TIIDUS, 1998). Essas citocinas também atuam no SNC, induzindo um somatório de comportamentos, no sistema nervoso simpático e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gonadal, o que causa exacerbação nos níveis sanguíneos das catecolaminas, glicocorticoides e hormônios gonadais (CUNHA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2006).

Pelo processo descrito, a comunicação entre o sistema nervoso central e sistema imune é crucial (ROGERO; MENDES; TIRAPEGUI, 2005). O hipotálamo, como já citado, é o órgão responsável por coordenar as respostas decorrentes dessas interações no sistema nervoso autônomo, nas glândulas adrenais e gonadais, tendo sua ação alterada quando do

desequilíbrio neuroendócrino (MACKINNON, 2000; MEEUSEN et al., 2004; SMITH, 2004; STEINACKER; LORMES, 2004).

Segundo Lehmann et al. (1998) a maior ativação do sistema nervoso autônomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal estão diretamente relacionados com os sintomas de OT, uma vez que o treinamento excessivo pode ser considerado um estress tanto físico quanto psicológico. Entretanto, Smith (2000) propõe que a ativação do sistema nervoso autônomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aliada à supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, representaria consequências da SOT e não necessariamente a sua causa.



**Figura 2** – Teoria das citocinas. Fonte: dados próprios

### 2.3 PARTICIPAÇÃO DA NUTRIÇÃO NAS ADAPTAÇÕES AO TREINAMENTO E PREVENÇÃO DO *OVERTRAINING*

O papel da nutrição como componente integral do desempenho atlético tem sido cada vez mais evidenciado (KREIDER et al., 2010). O avanço no entendimento do metabolismo e fisiologia do exercício deixou claro nas últimas décadas que a manipulação da ingestão de nutrientes tem o potencial de influenciar positivamente o desempenho esportivo e a recuperação entre as sessões de exercícios, resultando em um aumento na disponibilidade de

produtos com aplicações diversas para os praticantes de atividade física (MOLINERO; MÁRQUEZ, 2009).

Atualmente vários nutrientes tem sido propostos para influenciar as adaptações ao treinamento físico, retardando fadiga, acelerando recuperação, prevenindo OT e tratando atletas com sintomas desta síndrome.

Estratégias nutricionais são usadas primariamente para melhora do desempenho esportivo, seja por afetar diretamente algum aspecto relacionado ao metabolismo energético (e conseqüente retardamento da fadiga) ou por melhorar a recuperação no pós-exercício, como na mais eficiente ressíntese de glicogênio muscular e redução da imunossupressão (MAUGHAN, 2007; KREIDER et al., 2010b).

Dentre as principais estratégias, estão o uso de substâncias moduladoras do sistema imune (principalmente glutamina) (GLEESON, 2006), utilização de aminoácidos e suplementação de proteínas para redução do dano muscular/aceleração da recuperação (LOWERY; FORSYTHE, 2006), compostos com propriedades antioxidantes e adequação da ingestão de carboidratos (KARELIS et al., 2010; PETERNELJ; COOMBES, 2011).

Castell, Poortmans e Newsholme (1996) observaram que a ingestão oral de glutamina (5g diluída em 330 mL de água) imediatamente e após 2h de uma maratona foi capaz de reduzir o incidência de Infecções do Trato Respiratório Superior (ITRS) na semana subsequente à competição. No entanto, como Gleeson (2006) observou, outros aspectos relacionados à recuperação de exercícios extenuantes que não apenas a suplementação de glutamina, podem ter influenciado estes achados. Ademais, os achados na literatura apresentam resultados conflitantes entre exercícios de *endurance* e resistidos (BASSINI-CAMERON et al., 2008). Adicionalmente aos aspectos imunológicos benéficos, alguns autores reportaram que a glutamina pode ser usada para reposição de glicogênio muscular, uma vez que ela tem a capacidade de doar parte de seus carbonos para a ressíntese de glicogênio (VARNIER et al., 1995). Embora interessante, esta premissa ainda não foi demonstrada por meio de estudos científicos.

A utilização de proteínas (e alguns aminoácidos específicos que não apenas a glutamina) também tem sido referidos como capazes de melhorar as adaptações ao treinamento extenuante, e conseqüentemente à prevenção da SOT (LOWERY; FORSYTHE, 2006). Isso decorre do fato que a suplementação de proteínas pré e pós-exercício é capaz de atenuar o dano muscular induzido pelo exercício. Alguns mecanismos são propostos para explicar este efeito, como: efeito poupador do glicogênio, manutenção da glicemia durante o

exercício e dos precursores anapleróticos necessários para manutenção do funcionamento normal do ciclo de Krebs (MARTÍNEZ-LAGUNAS et al., 2010). Além disso, os aminoácidos de cadeia ramificada teriam papel central na prevenção da fadiga central e proteólise. Estes seriam em decorrência, principalmente, da leucina, que é capaz de estimular a enzima mTOR diretamente, tendo efeito anti-catabólico, além de poder ser oxidada no músculo esquelético para fornecimento de energia (PHILLIPS, 2012). No entanto, nenhum estudo controlado foi realizado para demonstrar que a utilização destes compostos são capazes de prevenir/minimizar aspectos diretamente relacionados ao OT em protocolos de exercício diretamente conduzidos para indução de OT.

Embora seja bem consolidado que o estado de OT esteja atrelado a um processo pró-inflamatório, de estresse oxidativo e de desequilíbrio hormonal (LIRA et al., 2010; DONG et al., 2011; FERRARESSO et al., 2012), é menos consistente na literatura que a suplementação de compostos antioxidantes tenha efeito benéfico em situações de alta demanda energética (FRANCA et al., 2010). Já foi demonstrado que em algumas situações específicas a suplementação com compostos antioxidantes demonstrou-se benéfica do ponto de vista do equilíbrio redox (SANTOS et al., 2012), não sendo encontrados, entretanto, estes mesmos benefícios na *performance* de atletas (FINAUD; BIOLOGIE, 2006). De maneira similar, nenhum ensaio foi conduzido até o presente momento testando essa hipótese na prevenção da SOT.

A estratégia nutricional mais eficaz para melhorar a imunidade parece ser a de garantir uma ingestão adequada de carboidratos durante todo o dia, bem como nos momentos pré e durante o treino (JEUKENDRUP, 2004). Esta estratégia objetiva minimizar a elevação dos níveis plasmáticos dos hormônios catabólicos durante o exercício (cortisol, catecolaminas), que se sabe terem um efeito imunossupressor (KARELIS et al., 2010; MCANULTY et al., 2007a). No entanto, se o exercício extenuante se prolonga, a estratégia de fornecimento contínuo de carboidratos parece estender o tempo de exercício, mas sem efeito sobre as respostas hormonais e imunológicas (PRITCHETT; PRITCHETT; BISHOP, 2011). Dessa maneira, parece que a manutenção de um nível adequado de ingestão de carboidratos, tanto ao longo do dia como no peri-exercício, continua a ser uma prioridade para a adaptação ao estímulo do exercício.

## 2.4 SUPLEMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS PARA RETARDAR FADIGA E ACELERAR RECUPERAÇÃO: CAPACIDADE DE PREVENIR OVERTRAINING?

Estudos investigando a relação do consumo de carboidrato peri-exercício tem se acumulado desde meados dos anos 20. Krogh e Lindhard (1920) foram os primeiros a demonstrar a importância do carboidrato como substrato energético durante o exercício. Neste estudo, os sujeitos relataram realizar o exercício mais facilmente com uma dieta hiperglicídica comparada a uma hiperlipídica, além de demonstrarem maior quociente respiratório durante a sessão de exercícios. Em 1923, Levine, Gordon e Derick (1924) observaram que maratonistas apresentaram níveis glicêmicos reduzidos ao final da corrida, sugerindo que estes baixos níveis tinham relação com a fadiga. Mais recentemente, por volta dos anos 80, outros estudos (BONEN et al., 1981; FELIG et al., 1982) vieram a ratificar o papel dos carboidratos como recurso ergogênico na prática desportiva. Desde então, o uso de carboidratos para atletas tornou-se prática comum, especialmente em modalidades de *endurance* (JEUKENDRUP, 2004).

Os efeitos benéficos da suplementação de carboidratos no exercício podem ser decorrentes de diversos mecanismos, podendo-se citar: atenuação da fadiga central, melhora do metabolismo do glicogênio e manutenção das taxas de oxidação de carboidratos, alteração dos níveis de metabólitos musculares, redução do dano muscular, inibição da imunossupressão e maior ressíntese de glicogênio (BETTS; WILLIAMS, 2010; KARELIS et al., 2010; KREIDER et al., 2010). Assim, é natural inferir que a utilização de carboidratos no contexto da atividade física possa ser estratégia nutricional relevante na melhora da resposta adaptativa à períodos de treinamento intenso, como em situações de OT. No entanto, embora carboidratos influenciem estes fatores que, coincidentemente ou não, estão envolvidos na etiologia do OT, até o momento nenhum estudo testou a influência dos carboidratos nestes mesmos parâmetros diante de protocolos que induziam OT em animais ou em humanos que estavam em estado de OT.

*Atenuação da Fadiga Central:* diversos fatores parecem estar envolvidos na prevenção da fadiga central com a ingestão de carboidratos, são eles: interferência na via do triptofano, prevenção da hipoglicemia, melhora da cognição e estímulo sobre o SNC. A suplementação de carboidratos inibiria o surgimento da fadiga central pelo efeito inibitório da liberação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea em exercícios de longa duração. Uma vez que estes ácidos graxos se ligam à albumina (que também transporta o triptofano), haveria um aumento das concentrações de triptofano livre (pela competição com os sítios de ligação à albumina) e

consequente maior conversão em serotonina no SNC. Decorrente do estímulo à secreção de insulina, e concomitante inibição da secreção de cortisol e catecolaminas, a suplementação de carboidratos manteria parte do triptofano ligado à albumina, incapaz, dessa maneira, de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (CURZON; FRIEDEL; KNOTT, 1973; DAVIS; BAILEY, 1997). Ora, como já relatado anteriormente, atletas em OT são sujeitos a apresentarem baixos níveis séricos de triptofano e, conseqüentemente, baixos níveis de serotonina no SNC, com suas repercussões negativas inerentes. Podemos conjecturar que, minimizando esses efeitos agudos dentro de um programa de treinamento físico extenuante se utilizando de estratégias nutricionais, ou seja a redução gradativa e cumulativa do triptofano sérico e conseqüentemente de serotonina no SNC, poderíamos prevenir ou retardar o surgimento desta síndrome.

Níveis circulantes de glicose parecem ser a principal fonte de energia para o SNC durante o exercício, e que seu suprimento contínuo seria necessário para a função de recrutamento da musculatura esquelética (PARDRIDGE, 1983; DALSGAARD; SECHER, 2007). Os achados de Koslowski, Brzezinska, Nazae (1981) confirmaram esta premissa. Em seu estudo, observaram que a manutenção do fornecimento de carboidrato ao cérebro possibilitou um estímulo neural adequado aos músculos. Outros estudos, como o de Nybo (2003), confirmam estes achados. No entanto, outros autores não obtiveram os mesmos resultados. Felig, cherif, Minagawa (1982) não constataram diferenças entre os grupos placebo e carboidrato no que se refere ao tempo de exaustão no exercício, nem tão pouco na percepção subjetiva do esforço. Horowitz e Coyle (1993) e Claassen, Lambert e Bosch (2005) também falharam em observar relação entre manutenção da glicemia e melhora do desempenho. Assim, hipoglicemia parece não ser necessariamente um mecanismo gerador de fadiga e que a manutenção da glicemia com a ingestão de carboidrato pode não ser um potencial mecanismo para melhora do desempenho no exercício (JEUKENDRUP, 2004).

Diversos outros estudos investigaram se a capacidade cognitiva de atletas era alterada com a ingestão de carboidratos (HOROWITZ; COYLE, 1993; CLAASSEN; LAMBERT; BOSCH, 2005; WINNICK; DAVIS; WELSH, 2005). Basicamente, após uma sessão extenuante de exercícios, os sujeitos dos estudos realizavam alguns testes de cognição. Em todos eles, melhores tempos de reação e percepção subjetiva do esforço foram obtidos. Dessa forma, estes autores demonstraram que a ingestão de carboidrato melhora a função cognitiva de atletas. No entanto, se esta melhora pode significar ganhos na *performance*, ou melhor

adaptação a um programa de treinamento físico extenuante como no OT, é algo que a literatura prévia não é capaz de atestar.

Outro ponto interessante do uso de carboidratos como recurso ergogênico atuando a nível central é com o enxague bucal. Alguns ensaios tem demonstrado efeito ergogênico com esta manobra (CARTER; JEUKENDRUP; JONES, 2004; POTTIER; BOUCKAERT; GILIS, 2008; CHAMBERS; BRIDGE; JONES, 2009). Segundo os autores destes estudos, a melhora observada no desempenho dos atletas pode ser em decorrência da presença de receptores de carboidrato na cavidade oral que possuem a capacidade de aumentar a estimulação nervosa relacionada à motivação. Chambers, Bridge e Jones (2009) demonstraram que esta manobra pôde aumentar a *performance* devido à ativação de certas regiões do cérebro envolvidas com recompensa e controle motor.

*Metabolismo do Glicogênio e Manutenção da Oxidação de Carboidratos:* em meados dos anos 80, Coyle et al. (1986) hipotetizaram que a manutenção da oxidação de carboidratos durante exercícios prolongados e/ou intensos poderia explicar o aumento da *performance* com a suplementação de carboidratos. À medida que estudos posteriores foram acontecendo, observou-se que a utilização de carboidratos foi capaz prorrogar a fadiga de 30 a 60 minutos, havendo redução da utilização de glicogênio muscular em torno de 20% a 28% (TSINTZAS; WILLIAMS, 1998) e foi associado com melhor manutenção da oxidação de carboidratos quando o glicogênio muscular estava reduzido (TSINTZAS; WILLIAMS, 1998).

Tem-se demonstrado que a suplementação de carboidratos é capaz de poupar o glicogênio hepático. Este é constantemente regulado, garantindo um constante fornecimento de glicose na presença ou ausência de carboidrato exógeno. Embora haja maior oxidação de carboidratos com o maior consumo deste, há redução da produção endógena (por meio de glicogenólise e gliconeogênese hepática) (KANG; ROBERTSON; DENYS, 1995). Alguns estudos reportam que com o consumo de elevadas quantidades de carboidratos a produção hepática de glicose retorna a seus níveis basais (HOWLETT et al., 1998), enquanto outros observaram completa inibição deste processo metabólico (JEUKENDRUP et al., 1999). Este efeito benéfico da suplementação denota que haverá carboidrato disponível nos momentos críticos do exercício físico, como na reta final de uma maratona (TSINTZAS; WILLIAMS, 1998). Assim, ao poupar as reservas energéticas endógenas, a suplementação de carboidratos previne e retarda o desgaste metabólico ao qual atletas em competições/treinamentos desgastantes estão sujeitos. Conseqüentemente, atletas em risco de desenvolvimento de OT seriam beneficiados.

Deve-se ressaltar, entretanto, que o aumento da oxidação de carboidratos e diminuição da depleção de glicogênio não podem ser considerados como a única razão da capacidade de manutenção ou desenvolvimento de força durante o exercício. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  pode estar relacionado aos mecanismos associando disponibilidade de glicogênio e *performance* no exercício (KARELIS et al., 2010).

*Metabólitos Musculares:* De acordo com Allen et al. (1992), Fi parece desempenhar papel central no desenvolvimento da fadiga. A suplementação com carboidratos poderia, então, estar associada com mudanças nas concentrações de metabólitos na fibra muscular (TSINTZAS; WILLIAMS, 1998). No estudo de Tsintzas e Williams (1998), houve aumento da *performance* de corrida com a suplementação de carboidrato, sendo este aumento associado com a atenuação do decréscimo dos níveis de PCr. Resultados semelhantes foram encontrados por (MCCONELL et al., 2000). Estes ainda verificaram que a suplementação de carboidratos atenuou o acúmulo de amônia, outro metabólito associado com o surgimento da fadiga. Bowtell; Gelly e Jackman (2000) sugerem que a causa da fadiga muscular pode ser decorrente de um insuficiente fornecimento de substrato (Acetil-CoA) para o Ciclo Tricarboxílico ou limitações desse ciclo devido à contrações reduzidas de seus intermediários. Yan, Spencer e Katz (1992) observaram os efeitos da suplementação de carboidratos nos níveis de intermediários do Ciclo Tricarboxílico. Nesse estudo, houve aumento da *performance*, sendo esta melhora positivamente associada com a manutenção dos intermediários.

Estes diversos estudos nos dão embasamento teórico para afirmar que a suplementação de carboidratos melhora as respostas adaptativas ao treinamento, uma vez que diversos aspectos bioquímicos foram positivamente afetados, e que estes achados podem ser extrapolados para o contexto do OT.

*Redução do dano muscular:* o dano muscular induzido pelo exercício e a dor muscular de início tardio (DMIT) são duas respostas naturais à prática de atividade física. Diversas teorias explanatórias desses fenômenos já foram promulgadas e refutadas; atualmente, aceita-se que esses dois fenômenos são decorrentes da geração de lesão muscular pela própria mecânica do exercício (como nos casos de exercício com alto componente excêntrico) e pela lesão muscular induzida por inflamação (que está associada à proteólise mediada pelo Ca) e ativação de radicais livres (MITCHELL, 2013). Espera-se que atletas em OT apresentem indícios de dano muscular acentuado, pelo contexto inflamatório e de estresse oxidativo que estão inseridos. Diversos marcadores indiretos de lesão muscular, como CK, lactato

desidrogenase (LDH) e mioglobina, tem sido usados para demonstrar este fenômeno. A suplementação de carboidratos seria capaz de minimizar as lesões musculares pelos efeitos metabólicos decorrentes de sua ingestão, principalmente relacionados aos níveis de insulina. Este hormônio, principalmente no momento pós-exercício, parece melhorar o balanço proteico, uma vez que, por seus efeitos anabólicos, suprime a degradação proteica induzida naturalmente pelo exercício (COCKBURN et al., 2008). Novamente, estes fatores são promulgados para atletas que não sofrem de OT. Se a suplementação deste composto nutricional é capaz de minimizar e/ou prevenir o surgimento deste estado, é algo que a literatura prévia não demonstrou.

*Prevenção da imunossupressão:* a suplementação de carboidratos pode ser efetiva na redução da imunossupressão induzida por exercícios, estresse oxidativo e dano muscular (MCANULTY et al., 2007; NIEMAN, 2007). Durante o exercício extenuante, como em casos de OT, a elevada produção de citocinas inflamatórias se relaciona à fadiga e dano muscular, estando associada com diminuição da produção de força e aumento do estresse oxidativo (SMITH, 2000). A ingestão de carboidrato tem a capacidade de reduzir o estresse oxidativo por diminuir a resposta hormonal de estresse ao exercício. Existem diversas prováveis associações entre aumento do estresse oxidativo e perfil hormonal. Um delas seria que as catecolaminas, elevadas em condições extremas, podem se auto-oxidar, gerando mais EROS. Além disso, altas concentrações de catecolaminas também têm se mostrado como capazes de aumentar a liberação de superóxido (pró-oxidante) pelos neutrófilos (RAMEL; WAGNER; ELMADFA, 2004).

Outra possibilidade é que altas concentrações de cortisol podem reduzir significativamente a glutathione, substrato importante na defesa antioxidante. Walther (2004) constatou que o tratamento de linhagens de células de pulmão com glicocorticóides baixou os níveis intracelulares deste antioxidante. Embora o mecanismo não possa ser definido, observou-se também que a *glutathione reductase* foi atenuada e a capacidade de ressíntese da glutathione foi inibida. Scharhag et al. (2006a) verificaram redução do estresse metabólico, evidenciado por menores índices de Proteína C Reativa, Interleucina – 6 e cortisol, com a suplementação de carboidratos durante exercícios de longa duração. Outros autores, como Mcanulty et al. (2007), observaram diminuição do estresse oxidativo. Dessa maneira, a suplementação de carboidratos no contexto do exercício físico seria capaz de reduzir o estresse oxidativo através de diversos mecanismos, como através da redução dos produtos de auto-oxidação de catecolaminas, no aumento da glutathione celular e na diminuição de

citocinas inflamatórias e de resposta imunitária. Pelo fato de atletas em OT tenderem a apresentar níveis elevados de hormônios catabólicos (principalmente cortisol) e reduzidos de hormônios anabólicos (testosterona), abre-se a possibilidade da suplementação de carboidratos no contexto do exercício ser benéfica pra atletas no contexto do OT. Esta premissa até o presente momento não foi testada.

*Ressíntese de glicogênio:* exercícios intensos e/ou de alto volume são possíveis principalmente devido aos estoques endógenos finitos de carboidrato, principal substrato energético de mamíferos. À medida que estes exercícios se tornam mais frequentes e intensos ao longo do dia/treinamento, a fadiga muscular vem a acontecer pela redução destes estoques, tanto a nível hepático como muscular (JEUKENDRUP, 2011). Dessa maneira, iniciar o exercício/treino com estoques adequados de carboidrato torna-se imprescindível para a manutenção da *performance*.

Neste contexto, uma melhor recuperação pós-exercício com a suplementação de carboidratos, no tocante à maior eficiência da ressíntese de glicogênio muscular, é prática necessária e recorrente para possível prevenção do OT, caracterizado como um estado onde a tolerância ao exercício físico contínuo e frequente é reduzida. Diversos autores reportam que o montante de carboidrato, bem como o tipo e o *timing* de consumo, além da presença de outros macronutrientes, são moduladores desta ressíntese de glicogênio (KARELIS et al., 2010). Diversos estudos, em diferentes modalidades esportivas como futebol, corrida e ciclismo (MCANULTY et al., 2007a; SKILLEN et al., 2008; VANDENBOGAERDE; HOPKINS, 2011; RUSSELL; BENTON; KINGSLEY, 2012) observaram que sessões subsequentes de exercício no mesmo dia, com intervalos menores que 8h entre sessões de treino, são realizados com maior eficiência, comprovados por menor percepção do esforço, fadiga retardada e menores níveis de hormônios catabólicos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 32 ratos machos adultos jovens da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *abinus*), com 12 semanas de vida, provenientes do biotério “Prof. Dr. Thomas Georgel” do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Eles foram divididos em três grupos:

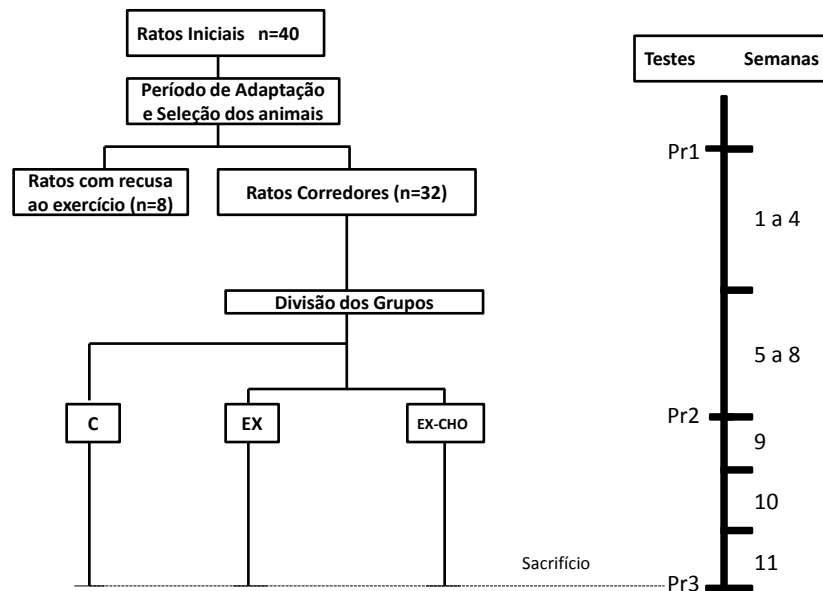
- Controle (sedentário (C)), n = 9;
- Grupo exercício sem suplementação (EX), n = 10;
- Grupo exercício suplementado apenas com carboidrato (EX-CHO), n = 13;

Os animais foram mantidos sob condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas), temperatura de  $22 \pm 1^\circ \text{C}$  e umidade de 65% (MERUSSE; LAPICHIK, 1996) e mantidos em gaiolas coletivas em grupos de cinco. Eles receberam diariamente água e ração *ad libitum*. Utilizou-se a ração comercial Labina® Purina e água destilada durante todo o período do estudo. A partir da 8ª semana de treinamento, foi adicionada uma suplementação de carboidrato à dieta do grupo experimental. Os procedimentos adotados estiveram de acordo com os princípios de manuseio e cuidado com animais de laboratório preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFPB sob protocolo de nº 1303/12.

#### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

A partir da 12ª semana de vida, os animais foram expostos a um protocolo de treinamento físico de corrida em esteira, adaptado de Hohl et al. (2009), constituído de duas semanas de adaptação mais onze semanas de treinamento regular. A partir 8ª semana, o treinamento sofreu um aumento brusco no volume, de modo a induzir OT nos animais. Quando desta mudança nas cargas de treino, o grupo experimental passou a receber doses diárias de carboidratos. Testes de *performance* foram realizados antes, após 8ª semana e no final do protocolo de treinamento. No final do protocolo de indução de OT, ratos de todos os grupos foram sacrificados para posterior análise de estresse oxidativo (MDA), marcadores de dano muscular (CK), hormônios testosterona e cortisol e atividade molecular das enzimas

Fosfatidil inositol 3 Quinase (PI3-K), Proteína Kinase B (Akt-1), Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) e Glicogênio Sintase Quinase 3 (Gsk-3). A figura 3 esquematiza este protocolo experimental.



**Figura 3** – Fluxograma dos testes de *performance* e semanas de treinamento do protocolo de indução de OT. Linhas pontilhadas: sacrifício dos ratos para coleta de sangue e amostras dos órgãos. Pr: *Performance* dos ratos; C: grupo sedentário; EX: grupo exercício sem suplementação; EX-CHO: grupo exercício com carboidrato.

### 3.3 PROTOCOLO DE ADAPTAÇÃO

Antes do início do protocolo de exercícios para indução de OT, os ratos tiveram duas semanas de adaptação à gavagem e corrida em esteira. Nestas semanas, realizou-se a seleção dos animais aptos ao protocolo de corrida. Para tanto, os animais foram sujeitos à corrida durante 10min/dia numa velocidade de 12m/min. Foram avaliados segundo a escala descrita por Lira et al. (2010). De acordo com esta, os animais foram ranqueados, diariamente, de acordo com os seguintes critérios: 1) refuta à corrida; 2) abaixo do corredor médio (corre e para; corre na direção errada); 3) corredor médio; 4) acima do corredor médio (corre constantemente, ocasionalmente correndo abaixo da velocidade da esteira); 5) bom corredor (consistentemente acima da velocidade da esteira). Animais com média de 3 ou mais ( $n = 32$ ) foram incluídos no estudo, enquanto os demais (com média abaixo de 3,  $n=8$ ) foram excluídos do experimento.

### 3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

O protocolo de treinamento iniciou logo na semana seguinte à adaptação e foi dividido em três fases, conforme apresentado na tabela 1. A primeira, fase de treinamento I (T1), consistiu de quatro semanas de treinamento com velocidade de corrida de 15 a 25 m/min. Na fase de ao treinamento II (T2), a velocidade de corrida e o tempo alcançados ao final da T1 foram mantidos por quatro semanas. T1 e T2 foram realizados no horário compreendido entre 13h e 17h, com uma sessão diária e intervalo de 24h entre as sessões. A terceira e última fase de treinamento teve duração de três semanas e se caracterizou por um aumento na frequência de treinamento para até quatro sessões diárias conforme mostrado na tabela 1. Em função do aumento no número de sessões diárias, o tempo de recuperação entre as sessões foi reduzido para 4, 3 e 2h, respectivamente. T3x e t4x foram realizados entre 10h e 17h. O volume de treinamento, em minutos, foi quantificado individualmente em cada sessão de treinamento.

**Tabela 1** – Protocolo de Treinamento. Adaptado de Hohl et al. (2009).

Semana Experimental	Frases de Treinamento	Velocidade de Treinamento (m - min)	Tempo de Treinamento (min)	Número de sessões diárias	Recuperação entre sessões (h)
1	T1	15	20	1	24
2	T1	20	30	1	24
3	T1	22,5	45	1	24
4	T1	25	60	1	24
5 – 8	T2	25	60	1	24
9	T2x	25	60	2	4
10	T3x	25	60	3	3
11	T4x	25	60	4	2

### 3.5 TESTES DE PERFORMANCE

Os testes para avaliação da *performance* foram realizados durante três ocasiões (após o período de adaptação e após a 8<sup>a</sup> e 11<sup>a</sup> semanas de treinamento). Os testes foram realizados 48h após da última sessão de treinamento da semana (entre 13h e 17h). Os ratos continuaram

o treinamento após 48h de descanso para permitir a recuperação antes do início da próxima semana de treinamento.

Os testes de *performance* iniciaram com os animais correndo numa esteira sem inclinação com uma velocidade inicial de 12 m/min durante cinco minutos. Logo após, a cada 3min a velocidade aumentou em 2m/min até a exaustão. A exaustão foi definida quando os animais não conseguiram manter a velocidade, mesmo depois de incitados três vezes pelos pesquisadores.

Para quantificar o desempenho foi utilizada a equação descrita por Hohl et al. (2009). Considerando-se todas as forças proporcionais ao Peso Corporal e todas as velocidades proporcionais a velocidade de corrida, energia mecânica torna-se proporcional à velocidade x massa. Tal suposição permite o desempenho do rato a ser medido através de uma quantidade que é proporcional a trabalho mecânico, ou seja, força x duração, como mostrado na equação.

$$Pr = \sum Pri = \sum mViTi = \sum mDi = mD$$

onde: Pr representa o desempenho do rato; Pri é o desempenho do rato em cada etapa, m é a massa corporal; Vi é o velocidade de estágio; Tj é o tempo de corrida em cada estágio; Di é a distância alcançada no estágio, e D é a distância total percorrida pelo rato durante o teste. Neste trabalho, Pr será expressa em quilogramas-metros (kg.m).

### 3.6 PROTOCOLO DE SUPLEMENTAÇÃO

As soluções utilizadas no estudo foram preparadas diariamente no Laboratório de Nutrição Experimental, do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba.

A partir da 8ª semana de treinamento, a suplementação foi realizada antes e imediatamente após a sessão de exercícios. Os animais foram suplementados por meio de gavagem com volume de 1,0 mL/100g de peso corpóreo, como descrito por Morifuji et al. (2010) e Morifuji et al. (2011). A proporção de 30% de carboidrato foi obedecida no grupo experimental. Nas duas últimas semanas do protocolo de exercícios a suplementação foi realizada antes e após a 1ª e 3ª sessões diárias.

### 3.7 CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar foi calculado semanalmente, no mesmo dia e horário, sendo representado pela diferença, em gramas, entre o alimento oferecido e o residual. Para essa determinação foi utilizada a fórmula: consumo = quota oferecida – rejeito limpo. Considerando-se rejeito sujo o alimento que não foi ingerido e ficou na área externa do comedouro, e rejeito limpo o alimento que não foi ingerido e permaneceu na área interna.

### 3.8 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPÓREA E CONTROLE DO CONSUMO DE RAÇÃO

A massa corpórea dos animais foi verificada duas vezes por semana, no início e fim das semanas de experimento antes das sessões de treinamento, onde utilizou-se balança analítica (Mettler, Suíça) – precisão: 0,1 g, capacidade máxima: 2610g. O controle do consumo da ração foi realizado nos mesmos dias, pesando-se na mesma balança a sobra da ração, e subtraindo da quantidade que foi estipulada a ser colocada como padrão, obtendo-se o consumo total por gaiola. Posteriormente foi calculada a média de consumo por animal.

No dia do sacrifício os animais foram pesados previamente para a comparação com seus valores respectivos de gordura visceral extraídos no momento do sacrifício.

### 3.9 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Passado o período experimental, 36h após o último teste de performance, e em jejum de 12h, os animais foram anestesiados com quetamina (75mg/kg) associado com xilazina (20mg/kg), por via intraperitoneal. Posteriormente os animais foram sacrificados por exsanguinamento, de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 3.10 COLETAS SANGUÍNEAS

O sangue foi retirado por punção cardíaca com seringa de 10 mL e agulha 25x7, sendo o material acondicionado em tubos para sorologia contendo ou não EDTA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos. As dosagens bioquímicas foram realizadas no soro para: Creatina Kinase (CK), testosterona e cortisol; no plasma:

Malondialdeído (MDA). As amostras foram centrifugadas imediatamente após a coleta e refrigeradas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise.

### **3.10.1 Creatina Kinase (CK)**

Utilizou-se um kit comercial, (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Um volume de 10  $\mu\text{l}$  de plasma foi adicionado a 1 ml do reagente de trabalho, conforme instruções do kit, e a leitura foi feita em um espectrofotômetro, modelo SP 22, a um comprimento de onda de 340 nm.

### **3.10.2 Malondialdeído (MDA)**

A atividade oxidante foi quantificada por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Para isto, 250  $\mu\text{l}$  de amostra foi adicionada a KCl e incubado em banho-maria a  $37^{\circ}$  por 60 minutos. Em seguida, a mistura foi precipitada com ácido perclórico AA 35% e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para novos ependorfs e adicionado 400 $\mu\text{l}$  de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubado a  $95 - 100^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após o resfriamento, o material foi lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532nm.

### **3. 10.3 Testosterona e cortisol**

Testosterona total foi analisada pelo método quimioluminescência por meio do analisador bioquímico automático Elecsys 2010 (Roche).

Cortisol foi analisado pelo método eletroquimioluminescência por meio do analisador bioquímico automático Elecsys 2010 (Roche).

## **3.11 EXPRESSÃO PROTÉICA DE GSK-3, PI3 K, AKT-1, mTOR**

O músculo gastrocnêmio foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetel de inibidor de protease e fosfatase (1:100). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$  com 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 ml e a concentração de proteína das amostras foram analisadas

por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da utilização.

Alíquotas do homogeneizado, 30 µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 240 mM; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200 mM; Glicerol 40% e Azul de bromofenol 0,02 %). A análise dos níveis protéicos foi realizada pela técnica de *western blotting*. Para isso, foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE, 6 - 12%: dependendo do peso molecular da proteína) (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1992). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, NJ, EUA), do mesmo modo que foram separadas no SDS-PAGE. As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas protéicas obtidas pela eletroforese.

Após incubada com caseína, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo primário. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseadish* peroxidase (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário. Foram utilizados como anticorpos primários o PI3K p110alfa (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), Akt1 (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), p-Akt1(Ser473) (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), eNOS (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), mTOR (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), p-mTOR (Ser2448) (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), GS3Kb (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), p-GS3Kb (Ser9) (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA). Em seguida as mesmas foram lavadas 3x10 min com TBS-T, incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários (todos anti-rabbit; Amersham Biosciences, NJ, EUA) conjugados à peroxidase. Posteriormente o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL) e os blots foram visualizados e quantificados (número de *pixels*) pelo sistema *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média. Realizou-se inicialmente o teste de Shapiro-Wilks para verificar normalidade dos dados e diferenças entre os desvios padrões das variáveis. Os dados considerados normais, utilizou-se o teste de

análise de variância (ANOVA) para comparar diferenças entre os grupos, com o uso *post hoc* de *Tukey*. Para as variáveis não-paramétricas, utilizou os testes de *Dunn*. Adotou-se nível de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os testes. Estes procedimentos foram realizados no software InStat 3.0.1 (Graph Pad Insta, San Diego, CA, USA).

## REFERÊNCIAS

- ACKEL-D'ELIA, C. et al. Absence of the predisposing factors and signs and symptoms usually associated with overreaching and overtraining in physical fitness centers. **Clinics**, v. 65, n. 11, p. 1161–1166, 2010.
- ALLEN, D. et al. Role of excitation-contraction coupling in muscle fatigue. **Sports Medicine**, v. 13, p. 116–126, 1992.
- ANANTARAMAN, R. et al. Effects of carbohydrate supplementation on performance during 1 hour of high-intensity exercise. **International journal of sports medicine**, v. 16, n. 7, p. 461–465, 1995.
- ANDREWS, J. et al. Carbohydrate loading and supplementation in endurance-trained women runners. **J Appl Physiol.**, v. 95, n. 2, p. 584–90, 2003.
- ARMSTRONG, L.; VANHEEST, J. The unknown mechanism of the overtraining syndrome. **Sports Medicine**, v. 32, n. 3, p. 185–209, 2002.
- BAILEY, S. et al. Impact of prolonged exercise in the heat and carbohydrate supplementation on performance of a virtual environment task. **Mil Med**, v. 173, n. 2, p. 187–92, 2008.
- BARRON, J.; NOAKES, T.; LEVY, W. Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 60, p. 803–806, 1985.
- BASSINI-CAMERON et al. Glutamine protects against increases in blood ammonia in football players in an exercise intensity-dependent way. **Br J Sports Med**, v. 42, n. 4, p. 260–6, 2008.
- BATY, J. J. et al. The effect of a carbohydrate and protein supplement on resistance exercise performance, hormonal response, and muscle damage. **Journal of strength and Conditioning Research**, v. 21, p. 321–329, 2007.
- BETTS, J. A.; WILLIAMS, C. Short-Term Recovery from Prolonged Exercise. **Sports Medicine**, v. 40, n. 11, p. 941–959, 2010.
- BONEN, A. et al. Glucose ingestion before and during intense exercise. **J Appl Physiol**, v. 50, p. 766, 1981.
- BOWTELL, J.; GELLY, K.; JACKMAN, M. Effect of different carbohydrate drinks on whole body carbohydrate storage after exhaustive exercise. **Journal of Applied ...**, v. 88, n. 5, p. 1529–1536, 2000.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BRESCIANI, G. et al. Intensified aerobic training and overload. **Int J Sports Med**, v. 32, p. 338 – 343, 2011.

- C PEREIRA, B. et al. A new overtraining protocol for mice based on downhill running sessions. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 39, n. 9, p. 793–98, 28 maio. 2012.
- CARTER, J. et al. Carbohydrate supplementation improves moderate and high-intensity exercise in the heat. **Pflugers Arch**, v. 446, n. 2, 2003.
- CARTER, J.; JEUKENDRUP, A.; JONES, D. The effect of carbohydrate mouth rinse on 1-h cycle time trial performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 12, p. 2107–11, 2004.
- CARVALHO, T.; RODRIGUES, T.; MEYER, F. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n. 3, p. 3–12, 2003.
- CASTELL, L. M.; POORTMANS, J. R.; NEWSHOLME, E. A. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes? **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 73, n. 5, p. 488–90, jan. 1996.
- CHAMBERS, E.; BRIDGE, M.; JONES, D. Carbohydrate sensing in the human mouth: effects on exercise performance and brain activity. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 8, p. 1779–94, 2009.
- CLAASSEN, A.; LAMBERT, E.; BOSCH, A. Variability in exercise capacity and metabolic response during endurance exercise after a low carbohydrate diet. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 15, n. 2, p. 97–116, 2005.
- CLOSE, G. L.; ASHTON, T.; CABLE, T. Ascorbic acid supplementation does not attenuate post-exercise muscle soreness following muscle-damaging exercise but may delay the recovery process. **Br J Nutr**, v. 95, p. 976–981, 2006.
- COCKBURN, E. et al. Acute milk-based protein-CHO supplementation attenuates exercise-induced muscle damage. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 33, n. 4, p. 775–83, 2008.
- COSTILL, D. L.; FLYNN, M. G.; KIRWAN, J. P. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 20, n. 3, p. 249–54, 1988.
- COUTTS, A. J. et al. Monitoring for overreaching in rugby league players. **European journal of applied physiology**, v. 99, n. 3, p. 313–24, fev. 2007.
- COYLE, E. et al. Muscle glycogen utilization during prolonged strenuous exercise when fed carbohydrate. **J Appl Physiol**, v. 61, n. 1, p. 165–72, 1986.
- CUNHA, S.; RIBEIRO, J. L.; OLIVEIRA, A. R. DE. Overtraining: theories, diagnosis and markers. v. 12, p. 267–271, 2006.
- CURZON, G.; FRIEDEL, J.; KNOTT, P. J. The effect of fatty acids on the binding of tryptophan to plasma protein. **Nature**, v. 242, n. 5394, p. 198–200, 1973.

- DALSGAARD, M. K.; SECHER, N. . The brain at work: a cerebral metabolic manifestation of central fatigue? **JNeurosci Res**, v. 85, n. 15, p. 3334–9, 2007.
- DAVIS, J. M.; BAILEY, S. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, n. 1, p. 45–57, 1997.
- 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. 881–91, jan. 2011.
- DUCLOS, M.; FOSTER, C.; STATES, U. Prevention, Diagnosis, and Treatment of the Overtraining Syndrome: Joint Consensus Statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, p. 186–205, 2012.
- FAHLSTRÖM, M. et al. Positive short-term subjective effect of sports drink supplementation during recovery. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 46, n. 4, p. 578–84, 2006.
- FELIG, P. et al. Hypoglycemia during prolonged exercise in normal men. **N Engl J Med**, v. 306, p. 895, 1982.
- FELIG, P.; CHERIF, A.; MINAGAWA, A. Hypoglycemia during prolonged exercise in normal men. **N Engl J Med**, v. 306, n. 15, p. 895–900, 1982.
- 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.
- FERRARESSO, R. L. P. et al. Interaction between Overtraining and the Interindividual Variability May (Not) Trigger Muscle Oxidative Stress and Cardiomyocyte Apoptosis in Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, p. 935483, jan. 2012.
- FINAUD, J.; BIOLOGIE, L. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. **Sports Medicine**, v. 36, n. 4, p. 327–358, 2006.
- FRANCA, G.; SILVA, A. Spirulina does not decrease muscle damage nor oxidative stress in cycling athletes with adequate nutritional status. **Biology of Sport**, p. 249–253, 2010.
- GLEESON, M. Can Nutrition Limit Exercise-induced Immunodepression? **Nutrition reviews**, v. 64, n. 3, 2006.
- GOULD, D. et al. **Positive and negative factors influencing U.S. Olympic athletes and coaches: Atlanta games assessment** Final grant report submitted to the U.S. Olympic Committee. **Anais...**1998
- HALSON, S. L. et al. Immunological responses to overreaching in cyclists. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 35, n. 5, p. 854–61, 2003.

HALSON, S. L. et al. Effects of carbohydrate supplementation on performance and carbohydrate oxidation after intensified cycling training. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 97, n. 4, p. 1245–53, out. 2004.

HALSON, S. L.; JEUKENDRUP, A. E. Does Overtraining exist? **Sports Medicine**, v. 34, n. 14, p. 967–981, 2004.

HARTMANN, U.; MESTER, J. Training and overtraining markers in selected sport events. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 2000.

HEDELIN, R. et al. Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. **Med. Sci. Sports Exerc**, v. 32, n. 8, p. 1480–1484, 2000.

HISCOCK, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise-induced immunodepression- plasma glutamine is not the link. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 93, n. 3, p. 813–22, set. 2002.

HOHL, R. et al. Development and characterization of an overtraining animal model. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 41, n. 5, p. 1155–63, maio. 2009.

HOOPER, S. et al. Hormonal responses of elite swimmers to overtraining. **Med Sci Sports Exerc**, v. 25, p. 741–7, 1993.

HOROWITZ, J. F.; COYLE, E. F. Metabolic responses to preexercise meals containing various carbohydrates and fat. **Am J Clin Nutr**, v. 58, n. 2, p. 235–41, 1993.

HOWLETT, K. et al. Effect of increased blood glucose availability on glucose kinetics during exercise. **Journal of Applied Physiology**, p. 1413–1417, 1998.

HUG, M. et al. Training modalities: overreaching and overtraining in athletes, including a study of the role of hormones. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 17, n. 2, p. 191–209, 2003.

JEUKENDRUP, A. E. et al. Glucose kinetics during prolonged exercise in highly trained human subjects: effect of glucose ingestion. **The Journal of physiology**, v. 515 ( Pt 2, p. 579–89, 1 mar. 1999.

JEUKENDRUP, A. E. Carbohydrate Intake During Exercise and Performance. 2004.

JEUKENDRUP, A. E. Nutrition for endurance sports: marathon, triathlon, and road cycling. **Journal of sports sciences**, v. 29 Suppl 1, n. September 2012, p. S91–9, jan. 2011.

KANG, J.; ROBERTSON, R.; DENYS, B. Effect of carbohydrate ingestion subsequent to carbohydrate supercompensation on endurance performance. **Int J Sport Nutr**, v. 5, n. 4, p. 329–43, 1995.

KARELIS, A. D. et al. Carbohydrate Administration and Exercise Performance. What Are the Potential Mechanisms Involved? **Sports Medicine**, v. 40, n. 9, p. 747–763, 2010.

KARELIS, A. D. et al. Carbohydrate Administration and Exercise Performance. **Sports Medicine**, v. 40, n. 9, p. 747–763, 2010.

KEIZER, H. Neuroendocrine aspects of overtraining. In: KREIDER, R.; O'TOOLE, M. (Eds.). **Overtraining in sport**. Champaign: Human Kinetics, 1998. p. 145–68.

KELLMANN, M. Underrecovery and overtraining. In: **Enhancing recovery, preventing underperformance in athletes**. Champaign: Human Kinetics, 2002. p. 1–24.

KENTTÄ, G.; HASSMÉN, P.; RAGLIN, J. S. Training practices and overtraining syndrome in Swedish age-group athletes. **International journal of sports medicine**, v. 22, n. 6, p. 460–5, ago. 2001.

KOSLOWSKI, S.; BRZEZINSKA, K.; NAZAE, E. Carbohydrate availability for the brain and muscle as a factor modifying sympathetic activity during exercise in dogs. In: POORTMANS, J.; NISSET, G. (Eds.). **Biochemistry of exercise**. Baltimore: University Park Press, 1981. p. 54–62.

KREGEL, K. et al. **Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols**. [s.l.: s.n.].

KREIDER, R. B. et al. Effects of carbohydrate supplementation during intense training on dietary patterns, psychological status, and performance. **Int J Sport Nutr**, v. 5, n. 2, 1995.

KREIDER, R. B. et al. Effects of ingesting protein with various forms of carbohydrate following resistance-exercise on substrate availability and markers of anabolism, catabolism, and immunity. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 4, p. 18, 2007.

KREIDER, R. B. et al. ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, p. 7, jan. 2010.

KREIDER, R. B. et al. ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, p. 7, jan. 2010.

KROGH, A.; LINDHARD, J. The relative value of fat and carbohydrate as sources of muscular energy. **Bioch J**, v. 14, p. 290, 1920.

LEHMANN, M. et al. Decreased nocturnal catecholamine excretion: parameter for an overtraining syndrome in athletes? **Int J Sports Med**, v. 13, n. 3, p. 236–242, 1992.

LEHMANN, M. et al. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 7, p. 1140–5, 1998.

LEHMANN, M. et al. Definition, types, symptoms, findings, underlining mechanisms, and frequency of overtraining and overtraining syndrome. In: KREIDER, R. B.; FRY, A. C.; O'TOOLE, M. L. (Eds.). **Overtraining in sport**. Champaign: Human Kinetics, 1998. p. 19–46.

LEHMANN, M.; FOSTER, C.; KEUL, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 25, n. 1, p. 854–61, 1993.

LEVINE, S. A.; GORDON, B.; DERICK, C. . Some changes in chemical constituents of blood following a marathon race. **JAMA**, v. 82, p. 1778, 1924.

LIRA, F. S. et al. Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. **Lipids in health and disease**, v. 9, p. 109, jan. 2010.

LOWERY, L.; FORSYTHE, C. E. Protein and Overtraining : Potential Applications for Free-Living Athletes. v. 3, n. 1, p. 42–50, 2006.

MACKINNON, L. T. Overtraining effects on immunity and performance in athletes. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. May, p. 502–509, 2000.

MACKINNON, L. T. Overtraining effects on immunity and performance in athletes. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 502–509, 2000.

MARGONIS, K. et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free radical biology & medicine**, v. 43, n. 6, p. 901–10, 15 set. 2007.

MARTÍNEZ-LAGUNAS, V. et al. Added Protein Mantains Efficacy of a low-carbohydrate sports drink. **Journal of strenght and Conditioning Research**, v. 24, n. 1, p. 48–59, 2010.

MAUGHAN, R. The athlete's diet: nutritional goals and dietary strategies. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 01, p. 87–96, 28 fev. 2007.

MCANULTY, S. R. et al. Influence of Carbohydrate , Intense Exercise , and Rest Intervals on Hormonal and Oxidative Changes. p. 478–490, 2007.

MCCONELL, G. et al. Effect of carbohydrate ingestion on glucose kinetics and muscle metabolism during intense endurance exercise. **J Appl Physiol**, v. 89, p. 1960, 2000.

MEEUSEN, R. et al. Hormonal responses in athletes: the use of a two bout exercise protocol to detect subtle differences in (over)training status. **European journal of applied physiology**, v. 91, n. 2-3, p. 140–6, mar. 2004.

MEEUSEN, R. et al. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome. **European Journal of Sports Science**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2006.

MEEUSEN, R. et al. Brain neurotransmitters in fatigue and overtraining. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, v. 864, p. 857–864, 2007.

MELTZER, H. Role of serotonin in depression. **Ann NY Acad Sci**, v. 600, p. 486–500, 1990.

MERUSSE, J.; LAPICHIK, V. Instalações e equipamentos. In: **Manual para técnicos em bioterismo**. [s.l: s.n.]. p. 15–25.

MITCHELL, J. B. Ingestion of carbohydrate during recovery in exercising people. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, 2013.

- MOLINERO, O.; MÁRQUEZ, S. Use of nutritional supplements in sports: risks, knowledge, and behavioural-related factors. **Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral**, v. 24, n. 2, p. 128–34, 2009.
- MORGAN, W. et al. Psychological characterization of the elite female distance runner. **Int J Sports Med.**, v. 8, n. suppl 2, p. 124–31, 1987.
- MORGAN, W. et al. Personality structure, mood states, and performance in elite male distance runners. **International Journal of Sport Psychology**, v. 19, n. 4, p. 247–263, 1988.
- MORGAN, W.; BROWN, D. Psychological monitoring of overtraining and staleness. **British Journal of ...**, v. 21, n. 3, p. 107–114, 1987.
- MORIFUJI, M. et al. Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle glycogen level in rats. **Amino acids**, v. 38, n. 4, p. 1109–15, abr. 2010.
- MORIFUJI, M. et al. Preexercise ingestion of carbohydrate plus whey protein hydrolysates attenuates skeletal muscle glycogen depletion during exercise in rats. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 27, n. 7-8, p. 833–7, 2011.
- NIEMAN, D. C. Marathon Training and Immune Function As . v. 37, p. 412–415, 2007.
- NIEMAN, D. C. Immunonutrition support for athletes. **Nutrition reviews**, v. 66, n. 6, p. 310–20, jun. 2008.
- NYBO, L. CNS fatigue and prolonged exercise: effect of glucose supplementation. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 4, p. 589–94, 2003.
- 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. 186–95, 2005.
- PARDRIDGE, W. M. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. **Physiol Rev**, v. 63, n. 4, p. 1481–535, 1983.
- PETERNELJ, T.; COOMBES, J. Antioxidant Supplementation during Exercise Training. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 41, n. 12, p. 1043–1069, 2011.
- PHILLIPS, S. Dietary protein requirements and adaptive advantages in athletes. **British Journal of Nutrition**, n. October, 2012.
- 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, 2002.
- POTTIER, A.; BOUCKAERT, J.; GILIS, W. Mouth rinse but not ingestion of a carbohydrate solution improves 1-h cycle time trial performance. **Scand J Med Sci Sports**, 2008.

PRITCHETT, K.; PRITCHETT, R.; BISHOP, P. Nutritional strategies for post-exercise recovery: a review. **South African Journal of Sports ...**, 2011.

RAGLIN, J. et al. Training Practices and Staleness in 13-18-Year-Old Swimmers: A Cross-Cultural Study. **Pediatric Sport Medicine**, v. 12, n. 1, p. 61–70, 2000.

RAGLIN, J.; WILSON, G. Overtraining in athletes. In: HANIN, Y. (Ed.). **Emotions in sport**. Champaign: Human Kinetics, 2000. p. 191–207.

RAMEL, A.; WAGNER, K.; ELMADFA, I. Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men. **Br. J. Sports Med**, v. 38, n. 22, 2004.

ROGERO, M. M.; MENDES, R. R.; TIRAPEGUI, J. Aspectos Neuroendócrinos e Nutricionais em Atletas Com Overtraining. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n. 3, 2005.

ROOSE, J.; VRIES, W. DE. Evaluation and opportunities in overtraining approaches. **Research Quarterly for Exercise and Sport**, v. 80, n. 4, p. 756–764, 2009.

ROWBOTTOM, D. G.; KEAST, D.; MORTON, A. R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Medicine**, v. 21, p. 80–97, 1996.

RUSSELL, M.; BENTON, D.; KINGSLEY, M. Influence of carbohydrate supplementation on skill performance during a soccer match simulation. **Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia**, v. 15, n. 4, p. 348–54, jul. 2012.

SANTOS, E. et al. Omega-3 Supplementation Attenuates the Production of C-Reactive Protein in Military Personnel During 5 Days of Intense Physical Stress and Nutritional Restriction. **Biology of Sport**, v. 29, n. 2, p. 93–99, 4 abr. 2012.

SCHARHAG, J. et al. Effects of graded carbohydrate supplementation on the immune response in cycling. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 38, n. 2, p. 286–92, 2006.

SCHUMM, S. et al. Hormonal response to carbohydrate supplementation at rest and after resistance exercise. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 18, n. 3, p. 260–280, 2008.

SKILLEN, R. A. et al. Effects of an amino acid carbohydrate drink on exercise performance after consecutive-day exercise bouts. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 18, n. 5, p. 473–92, 2008.

SLIVKA, D. R. et al. Effects of 21 days of intensified training on markers of overtraining. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 24, n. 10, p. 2604–2612, 2010.

SMITH, L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress. **Medicine and science in sports and exercise**, 2000.

SMITH, L. L. TISSUE TRAUMA: THE UNDERLYING CAUSE OF OVERTRAINING SYNDROME? **Journal of strength and Conditioning Research**, v. 18, n. 1, p. 185–193, 2004.

SNYDER, A. et al. Overtraining following intensified training with normal muscle glycogen. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, n. 7, p. 1063–1070, 1995.

SNYDER, A. C. et al. Overtraining following intensified training with normal muscle glycogen. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, n. 7, p. 1063–1070, 1995.

SOBAL, J.; MARQUART, L. F. Vitamin/mineral supplement use among athletes: a review of the literature. **Int J Sport Nutr**, v. 4, n. 4, p. 320–334, 1994.

STEINACKER, J.; LORMES, W. New aspects of the hormone and cytokine response to training. **European journal of ...**, v. 91, p. 382–391, 2004.

TANSKANEN, M.; ATALAY, M.; UUSITALO, A. Altered oxidative stress in overtrained athletes. **Journal of Sports Sciences**, v. 28, n. 3, p. 309–317, 2010.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 533–538, 1998.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 24, n. 9, p. 145–9, jan. 1992.

TSINTZAS, K.; WILLIAMS, C. Human muscle glycogen metabolism during exercise. Effect of carbohydrate supplementation. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 25, n. 1, p. 7–23, 1998.

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

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

VAN LOON, L. J. et al. Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 1, p. 106–11, jul. 2000.

VANDEBOGAERDE, T.; HOPKINS, W. Effects of Acute Carbohydrate Supplementation on Endurance Performance. **Sports Medicine**, v. 41, n. 9, p. 773–792, 2011.

VARNIER, M. et al. Stimulatory effect of glutamine on glycogen accumulation in human skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 269, n. 2, p. 309–315, 1995.

VERMA, S.; MAHINDROO, S.; KANSAL, D. Effect of four weeks of hard physical training on certain physiological and morphological parameters of basket-ball players. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 18, n. 4, p. 379–384, 1978.

WALSH, N. et al. Glutamine, exercise and immune function. Links and possible mechanisms. **Sports Medicine**, v. 26, n. 3, p. 177–91, 1998.

WALTHER, U. Changes in the glutathione system of lung cell lines after treatment with hydrocortisone. **Arch. Toxicol**, v. 78, p. 402–409, 2004.

WELSH, R. et al. Carbohydrates and physical/mental performance during intermittent exercise to fatigue. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 4, p. 723–31, 2002.

WINNICK, J.; DAVIS, J.; WELSH, R. Carbohydrate feedings during team sport exercise preserve physical and CNS function. **Med Sci Sports Exerc**, v. 37, n. 2, p. 306–15, 2005.

XIAO, W.; CHEN, P.; DONG, J. Effects of Overtraining on Skeletal Muscle Growth and Gene Expression. **Int J Sports Med.**, v. 33, n. 10, p. 846–53, 2012.

YAN, Z.; SPENCER, M.; KATZ, A. Effect of low glycogen on glycogen synthase in human muscle during and after exercise. **Acta Physiol Scand**, v. 145, p. 345–52, 1992.

# **ANEXOS**

**ANEXO A - Composição da ração comercial Labina®**

ENRIQUECIMENTO (KG DE RAÇÃO) <sup>(*)</sup>	
Vitamina A	20000UI
Vitamina D <sub>3</sub>	6000 UI
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B <sub>12</sub>	10 µg
Vitamina B <sub>2</sub>	8 mg
Pantotenato de Cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0.1 mg
Ácido Fólico	0.5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	65 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Antioxidante	100 mg

NÍVEIS DE GARANTIA <sup>(*)</sup>	
Umidade (máx.)	13%
Proteína (mín.)	23%
Extrato Etéreo (mín.)	2.5%
Matéria Fibrosa (máx.)	9.0%
Matéria Mineral (máx.)	8.0%
Cálcio (máx.)	1.8%
Fósforo (mín.)	0.0%

Composição Básica <sup>(\*)</sup>: Milho, Farelo de Trigo, Farelo de Soja, Farinha de Carne, Farelo de Arroz cru, Carboneto de Cálcio, Fostato Bicálcico, Sal, Pré-mix.

<sup>(\*)</sup> Segundo Purina do Brasil

Composição	Padrão*
<b>Carboidratos (g)</b>	<b>7,75</b>
<b>Lipídios (g)</b>	<b>0,8</b>
<b>Caseína</b>	<b>-</b>
<b>Glutamina</b>	<b>-</b>
<b>Proteínas (g)</b>	<b>4,6</b>
<b>Probióticos (colônias)</b>	<b>0</b>
<b>Calorias (Kcal)</b>	<b>56</b>
<b>Peso Total (g)</b>	<b>20</b>

Ração Labina, Purina, São Paulo

## ANEXO B - Composição do Suplemento Dextrose

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Quantidade por porção - 50g do pó		VD % (*)
Valor Energético	191 kcal	10
Carboidratos	48 g	16
Proteína	0	0
Gorduras Totais	0	**
Gorduras Saturadas	0	0
Gorduras Trans	0	0
Fibra Alimentar	0	0
Sódio	90 mg	4
Cloreto	139 mg	**

(\*) % Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. (\*\*\*) Aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA).

**ANEXO C - Composição do Suplemento *Whey Protein Isolada***

<b>Informação Nutricional</b>				
<b>Por porção de 6g (1 colher)</b>				
	<b>6g</b>	<b>%VD(*)</b>	<b>100g</b>	<b>%VD(*)</b>
Valor Energético	22 Kcal = 92Kj	1	366 Kcal = 1537 Kj	18
Carboidratos	0g	0	0g	0
<b>Proteínas</b>	<b>5,5g</b>	<b>7</b>	<b>92g</b>	<b>23</b>
Gorduras Totais	0g	0	0g	0
Gorduras Saturadas	0g	0	0g	0
Gorduras Trans	0g	-	0g	-
Fibra Alimentar	0g	0	0g	0
Sódio	12mg	1	200mg	8

\*% Valores Diários com base em uma dieta de 2.000Kcal. Seus Valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

**ARTIGO**

**SUPLEMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS ATENUA QUEDA DA PERFORMANCE  
E PROMOVE AUMENTO DA ATIVIDADE DA AKT-1 EM RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS A OVERTRAINING**

**PERIÓDICO:** Plos One

**ÁREA:** Nutrição

**QUALIS:** A1

**ISSN:** 1932-6203

**FATOR DE IMPACTO:** 4.092

## **SUPLEMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS ATENUA QUEDA DA PERFORMANCE E PROMOVE AUMENTO DA ATIVIDADE DA AKT-1 EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A OVERTRAINING**

### **Carboidratos e Prevenção do Overtraining**

Caio Victor de Oliveira<sup>a</sup>, Carlos Vinícius Barbosa<sup>a</sup>, Nayara Moreira Massa<sup>a</sup>, Reabias Andrade<sup>b</sup>, Gustavo Félix<sup>b</sup>, Jailane de Souza Aquino<sup>c</sup>, Edilamar Menezes de Oliveira<sup>d</sup>,  
Alexandre Sérgio Silva<sup>ae</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós graduação em Ciências da Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>b</sup> Graduação em Educação Física, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>c</sup> Programa de Pós graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano, da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>e</sup> Programa de Pós graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Educação Física, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

**Endereço correspondência do autor:** Rua Joaquim Caroca, n 146, Conjunto dos Professores, Campina Grande – Paraíba. Brasil. CEP: 58429-120. E-mail: caiovco@gmail.com Telefone: +55 (83) 8787-4238

**Conflitos de interesse:** nenhum

## RESUMO

**Introdução:** A capacidade ergogênica dos carboidratos é bem demonstrada para retardar fadiga e acelerar recuperação em sessões únicas de exercícios, mas não em resposta a programas de treinamento físico. **Objetivo:** verificar se a suplementação de carboidratos é capaz de prevenir overtraining (OT) em ratos Wistar. **Materiais e Métodos:** Animais foram submetidos a 11 semanas de treinamento de corrida em esteira, sendo as 3 últimas semanas destinadas a induzir estado de OT, tendo um grupo suplementado (EX-CHO; n=13) e outro sem suplementação (EX; n=10). Outro grupo permaneceu sedentário (C; n=9). Testes de performance (Pr) foram realizados antes da 1ª semana (Pr1) e ao término da 8ª (Pr2) e 11ª (Pr3). Consumo alimentar, peso corporal, níveis de testosterona, cortisol, Malondialdeído (MDA), Creatina Kinase (CK) e atividade das enzimas PI3-K, Akt-1, mTOR e GSK-3 foram mensuradas. **Resultados:** Ocorreu redução do desempenho em Pr3 em relação ao Pr2 ( $p>0,05$ ), mas apenas no grupo não suplementado (EX). Estes animais apresentaram redução do consumo alimentar, sendo que EX-CHO manteve a mesma ingestão ( $p>0,05$ ). Adicionalmente, EX-CHO terminou o protocolo com peso do gastrocnêmio maior que C ( $p=0,02$ ), sem que o mesmo tenha ocorrido em EX. O protocolo de treinamento promoveu diminuição da testosterona ( $p=0,001$ ) e elevação de MDA ( $p=0,009$ ) nos grupos exercício em relação a C, sem que a suplementação de carboidratos tenha influenciado estas variáveis ( $p>0,05$ ). A atividade da Akt-1 apresentou-se maior apenas em EX-CHO comparado a C ( $p=0,013$ ), enquanto mTOR não diferiu entre os grupos ( $p>0,05$ ). **Conclusão:** suplementação de carboidratos promove discreta atenuação na queda da performance, inibição da anorexia e aumento da massa muscular em animais submetidos a protocolo de OT. Este ganho muscular foi acompanhado pela maior atividade do sinalizador molecular anabólico e anti-catabólico Akt-1. Por outro lado, não preveniu alterações nos marcadores de OT estresse oxidativo, perfil hormonal e dano muscular.

**Palavras-chave:** Carboidrato, *Performance*, *Overtraining*, Akt-1

## INTRODUÇÃO

A síndrome de *overtraining* (SOT) é fenômeno cuja prevalência tem aumentado entre atletas de alto rendimento [1,2]. Estima-se que os sintomas de SOT já chegaram a atingir, em algum momento da carreira profissional, 37% de atletas de elite de diversas modalidades [3], 65% dos corredores de longa distância [4], 50% dos jogadores de futebol semi-profissional e 21% dos nadadores da equipe nacional australiana [2].

É caracterizada por uma diminuição de desempenho [2,5,6], podendo perdurar por semanas ou até meses, mesmo após descanso [7]. É resultante de um desbalanço entre um excesso de treinamento com inadequada recuperação e/ou nutrição [8–10]. Fisiologicamente ocorrem perturbações bioquímicas, imunológicas, hormonais e psicológicas sem, entretanto, apresentar um único fator causal nem ferramenta diagnóstica definitiva [5,9,11,12].

Considerando que a alimentação é fator importante na etiologia do *overtraining* (OT), seu principal aspecto relacionado à prática de exercícios é a capacidade dos nutrientes de promover efeitos ergogênicos capazes de acelerar a recuperação entre as sessões de treinamento [13]. Neste sentido, a utilização de recursos nutricionais com esta finalidade ergogênica tem crescido consideravelmente [14,15].

Embora a real necessidade da suplementação nutricional seja tema controverso na literatura atual, o valor ergogênico da suplementação de carboidratos é reconhecido pela maioria dos pesquisadores como eficaz em retardar a fadiga em exercícios de resistência [16,17], aumentar a taxa de ressíntese de glicogênio [18] além de restaurar a capacidade física mais rapidamente [16]. Este retardo da fadiga também foi confirmado em várias condições específicas, como em exercícios aeróbicos realizados sob calor [19,20], no retardo da fadiga central [21,22], na recuperação após a sessão de treinamento, bem como elevação da insulinemia durante os exercícios [23]. Portanto existe consenso de que os carboidratos tem capacidade ergogênica no exercício físico.

Sendo os carboidratos capazes de acelerar a recuperação pós-exercício, este fenômeno suporta as bases para sustentar a hipótese de que várias sessões de treinamento intenso seguidas deste estímulo à recuperação minimizaria ou evitaria o desenvolvimento do processo de OT. No entanto, até o momento não é possível atribuir aos carboidratos o que seria esta nova capacidade ergogênica de prevenir o OT. Isto não é possível porque os estudos que mostram mais rápida recuperação pós-exercício foram feitos com base em uma única ou poucas sessões [24].

Além disso, os trabalhos existentes são restritos à síntese proteica muscular, ressíntese de glicogênio, aumento de desempenho e marcadores de catabolismo proteico bem como de estresse oxidativo em resposta a diferentes formas de suplementação e protocolos de exercício, não sendo contemplados vários dos marcadores importantes relacionados ao OT [18,25–29]. Até o presente momento, poucos estudos investigaram o efeito ergogênico do carboidrato na prevenção do OT, em ciclistas, corredores e atletas de *badminton* [30–32]. No entanto, vários aspectos relevantes, como os moleculares, não foram explorados nestes trabalhos. Apenas fatores fisiológicos (frequência cardíaca), psicológicos, de ansiedade, antropométricos e hematológicos (hemoglobina e cortisol) foram contemplados.

Diante disso, hipotetizamos que, em decorrência dos diversos efeitos ergogênicos dos carboidratos no contexto do exercício físico, sua utilização é capaz de prevenir ou minimizar o surgimento do estado de OT. Portanto, o objetivo do presente estudo é verificar se a suplementação de carboidratos é capaz de prevenir ou minimizar o estado de OT em ratos *Wistar* adultos machos, considerando aspectos bioquímicos, de estresse oxidativo, hormonais e moleculares.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais:** foram utilizados 32 ratos machos adultos jovens da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade *abinus*), com 12 semanas de vida, provenientes do biotério “Prof. Dr. Thomas Georgel” do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Foram divididos em três grupos: Controle sedentário (C), n = 9; Grupo exercício sem suplementação (EX), n = 10 e Grupo exercício suplementado apenas com carboidrato (EX-CHO), n = 13. Os animais foram mantidos sob condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas), temperatura de  $22 \pm 1^\circ \text{C}$  e umidade de 65% [33] e mantidos em gaiolas coletivas em grupos de cinco. Eles receberam diariamente água e ração *ad libitum*. Os procedimentos adotados estiveram de acordo com os princípios de manuseio e cuidado com animais de laboratório preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFPB sob protocolo de nº 1303/12.

**Protocolo de adaptação:** antes do início do protocolo de exercícios para indução de OT, os ratos tiveram duas semanas de adaptação à gavagem e corrida em esteira. Nestas semanas,

realizou-se a seleção dos animais aptos ao protocolo de corrida. Para tanto, os animais foram sujeitos à corrida durante 10min/dia numa velocidade de 12m/min. Foram avaliados segundo a escala descrita por Lira et al. (2010)[34]. De acordo com esta, os animais foram ranqueados, diariamente, de acordo com os seguintes critérios: 1) refuta à corrida; 2) abaixo do corredor médio (corre e para; corre na direção errada); 3) corredor médio; 4) acima do corredor médio (corre constantemente, ocasionalmente correndo abaixo da velocidade da esteira); 5) bom corredor (consistentemente acima da velocidade da esteira). Animais com média de 3 ou mais (n = 32) foram incluídos no estudo, enquanto os demais (com média abaixo de 3, n=8) foram excluídos do experimento.

**Protocolo de treinamento:** o protocolo de treinamento iniciou logo na semana seguinte à adaptação e foi dividido em três fases, conforme apresentado na tabela 1. A primeira, fase de treinamento I (T1), consistiu de quatro semanas de treinamento com velocidade de corrida de 15 a 25 m/min. Na fase de ao treinamento II (T2), a velocidade de corrida e o tempo alcançados ao final da T1 foram mantidos por quatro semanas. T1 e T2 foram realizados no horário compreendido entre 13h e 17h, com uma sessão diária e intervalo de 24h entre as sessões. A terceira e última fase de treinamento teve duração de três semanas e se caracterizou por um aumento na frequência de treinamento para até quatro sessões diárias conforme mostrado na tabela 1. Em função do aumento no número de sessões diárias, o tempo de recuperação entre as sessões foi reduzido para 4, 3 e 2h, respectivamente. T3x e t4x foram realizados entre 10h e 17h. O volume de treinamento, em minutos, foi quantificado individualmente em cada sessão de treinamento.

#### **Tabela 1 – Protocolo de Treinamento**

**Testes de Performance:** Os testes para avaliação da *performance* foram realizados durante três ocasiões (após o período de adaptação e após a 8<sup>a</sup> e 11<sup>a</sup> semanas de treinamento). Os testes foram realizados 48h após da última sessão de treinamento da semana (entre 13h e 17h). Os ratos continuaram o treinamento após 48h de descanso para permitir a recuperação antes do início da próxima semana de treinamento. Os testes de *performance* iniciaram com os animais correndo numa esteira sem inclinação com uma velocidade inicial de 12 m/min durante cinco minutos. Logo após, a cada 3min a velocidade aumentou em 2m/min até a exaustão. A exaustão foi definida quando os animais não conseguiram manter a velocidade,

mesmo depois de incitados três vezes pelos pesquisadores. Para quantificar o desempenho foi utilizada a equação descrita por Hohl et al. (2009)[35]. Considerando-se todas as forças proporcionais ao Peso Corporal e todas as velocidades proporcionais a velocidade de corrida, energia mecânica torna-se proporcional à velocidade x massa. Tal suposição permite o desempenho do rato a ser medido através de uma quantidade que é proporcional a trabalho mecânico, ou seja, força x duração, como mostrado na equação.

$$Pr = \sum Pri = \sum mViTi = \sum mDi = mD$$

onde: Pr representa o desempenho do rato; Pri é o desempenho do rato em cada etapa, m é a massa corporal; Vi é o velocidade de estágio; Tj é o tempo de corrida em cada estágio; Di é a distância alcançada no estágio, e D é a distância total percorrida pelo rato durante o teste. Neste trabalho, Pr será expressa em quilogramas-metros (kg.m).

**Figura 1** – Fluxograma dos testes de *performance* e semanas de treinamento do protocolo de OT

**Protocolo de Suplementação:** as soluções utilizadas no estudo foram preparadas diariamente no Laboratório de Nutrição Experimental, do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba. A partir da 8ª semana de treinamento, a suplementação foi realizada antes e imediatamente após a sessão de exercícios. Os animais foram suplementados por meio de gavagem com volume de 1,0 mL/100g de peso corpóreo, como descrito por Morifugi et al. (2010)[26] e Morifugi et al. (2011)[25]. A proporção de 30% de carboidrato foi obedecida no grupo experimental. Nas duas últimas semanas do protocolo de exercícios a suplementação foi realizada antes e após a 1ª e 3ª sessões diárias.

**Sacrifício dos animais:** passado o período experimental, 36h após o último teste de *performance*, e em jejum de 12h, os animais foram anestesiados com quetamina (75mg/kg) associado com xilazina (20mg/kg), por via intraperitoneal. Posteriormente os animais foram sacrificados por exsanguinamento, de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

**Análises bioquímicas:** O sangue foi retirado por punção cardíaca com seringa de 10 mL e agulha 25x7, sendo o material acondicionado em tubos para sorologia contendo ou não

EDTA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos. As dosagens bioquímicas foram realizadas no soro para: Creatina Kinase (CK), utilizando kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil); testosterona e cortisol, pelo método de quimioluminescência por meio do analisador bioquímico automático Elecsys 2010 (Roche); no plasma: Malondialdeído (MDA). As amostras foram centrifugadas imediatamente após a coleta e refrigeradas a -80° C até a análise.

**Expressão protéica de GSK-3, PI3-K, Akt-1, mTOR:** O músculo gastrocnêmio foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetel de inibidor de protease e fosfatase (1:100). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos à 4°C com 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 ml e a concentração de proteína das amostras foram analisadas por meio do método de BRADFORD (1976) [36]. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da utilização.

Alíquotas do homogeneizado, 30 µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 240 mM; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200 mM; Glicerol 40% e Azul de bromofenol 0,02 %). A análise dos níveis protéicos foi realizada pela técnica de *western blotting*. Para isso, foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE, 6 - 12%: dependendo do peso molecular da proteína)[37]. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, NJ, EUA), do mesmo modo que foram separadas no SDS-PAGE. As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas proteicas obtidas pela eletroforese.

Após incubada com caseína, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo primário. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseadish* peroxidase (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário. Foram utilizados como anticorpos primários o PI3K p110alfa (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), Akt1 (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), p-Akt1(Ser473) (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), mTOR (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), p-mTOR (Ser2448) (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), GS3Kb (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), p-GS3Kb (Ser9) (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA). Em seguida as mesmas foram lavadas 3x10 min com TBS-T, incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários (todos anti-

rabbit; Amersham Biosciences, NJ, EUA) conjugados à peroxidase. Posteriormente o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL) e os blots foram visualizados e quantificados (número de *pixels*) pelo sistema *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador.

**Análises Estatísticas:** Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média. Realizou-se inicialmente o teste de Shapiro-Wilks para verificar normalidade dos dados e diferenças entre os desvios padrões das variáveis. Os dados considerados normais, utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) para comparar diferenças entre os grupos, com o uso *post hoc* de *Tukey*. Para as variáveis não-paramétricas, utilizou os testes de *Dunn*. Adotou-se nível de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os testes. Estes procedimentos foram realizados no software *Instat 3.0.1* (Graph Pad Insta, San Diego, CA, USA).

## RESULTADOS

**Performance:** os valores dos testes de *performance* (Pr) (Kg.m) dos animais estão expressos na figura 2. Observou-se uma melhora nos valores de *performance* de EX e EX-CHO no Pr2 em relação a Pr1 ( $p < 0,001$ ). No Pr3, houve decréscimo nestes grupos quando comparados aos seus respectivos valores de Pr2. No entanto, apenas em EX-CHO neste momento não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

**Figura 2** – *Performance* de C, EX e EX-CHO nos três Pr

**Consumo Alimentar:** durante a 8<sup>a</sup> semana de treinamento, os grupos não apresentaram diferenças no consumo alimentar ( $p > 0,05$ ). Durante a 9<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semanas de treinamento, o consumo alimentar do grupo EX não diferiu do C nem de EX-CHO ( $p > 0,05$ ), enquanto que EX-CHO apresentou diferenças em relação a C ( $p < 0,05$ ). Ao término do protocolo experimental, foi observado no grupo EX uma redução do consumo alimentar em relação a C ( $p < 0,01$ ), o que não ocorreu com EX-CHO ( $p > 0,05$ ). No entanto, não foram observadas diferenças entre EX e EX-CHO ( $p > 0,05$ ).

**Figura 3** – Consumo Alimentar em C, EX e EX-CHO nas semanas do protocolo experimental.

**Peso dos Animais e Órgãos e Gordura Peritoneal:** a tabela 2 mostra a repercussão das 11 semanas de treinamento sobre o peso ponderal dos animais, dos músculos cardíaco e gastrocnêmio e sobre a gordura da cavidade peritoneal. Os resultados demonstram que os animais submetidos ao treinamento físico tiveram uma redução significativa no peso corporal ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo C, sendo a gordura peritoneal absoluta e corrigida também afetadas ( $p < 0,001$ ). No entanto, não houve diferenças entre os grupos EX e EX-CHO ( $p > 0,05$ ). Em relação aos músculos, o peso absoluto dos gastrocnêmios dos grupos EX e EX-CHO apresentaram-se menores quando comparados aos do C ( $p < 0,001$ ), sem apresentarem diferenças entre si ( $p > 0,05$ ); quando corrigidos pelos respectivos pesos corporais, observou diferenças apenas para o grupo EX-CHO em relação ao C ( $p < 0,05$ ), sem diferenças entre EX-CHO e EX ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2 -** Peso dos Animais e Órgãos e Gordura Peritoneal

**Análises sanguíneas:** os parâmetros hormonais, inflamatórios, de dano muscular e de estresse oxidativo ao final do protocolo experimental estão descritos na tabela 3. Os níveis de Creatina Kinase (CK) e cortisol não diferiram entre nenhum dos grupos ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, os níveis do hormônio testosterona e de Malondialdeído (MDA) foram negativamente afetados ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente).

**Tabela 3 –** Análises sanguíneas

**Aspectos Moleculares:** as análises das atividades das proteínas musculares relacionados à síntese de glicogênio e via de síntese proteica estão demonstradas na figura 4. A atividade da Glicogênio  *sintase* nos grupos EX e EX-CHO demonstrou-se significativamente maior que em C ( $p < 0,01$ ). De maneira similar, a PI3K também se mostrou mais ativa em EX e EX-CHO ( $p < 0,001$ ) em relação a C, enquanto que a Akt-1 apenas no grupo EX-CHO em relação a C ( $P < 0,05$ ). Contrastando com estes resultados, a atividade mTor não apresentou diferenças em nenhum dos grupos ( $p > 0,05$ ).

**Figura 4 –** Atividade proteica de GS, PI3K, Akt1 e mTOR em C, EX e EX-CHO

## DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo corresponde ao fato de que a suplementação de carboidratos foi capaz de promover discreta atenuação em alguns parâmetros do OT, os quais foram queda de desempenho, redução no consumo alimentar e promoveu aumento da massa muscular do gastrocnêmio, acompanhada de aumento de atividade da Akt-1. No entanto, não teve influência em vários outros marcadores de OT: bioquímicos, hormonais, de estresse oxidativo e composição corporal, nem na atividade de outras enzimas envolvidas na síntese proteica além da Akt-1.

O protocolo de exercícios utilizado para induzir OT baseou-se em um protocolo previamente validado[35]. O desequilíbrio provocado pelas 11 semanas de treinamento foi evidenciado pelas repercussões deletérias observadas no grupo EX em relação a C. Os animais apresentaram diminuição da *performance*, redução do peso, gordura e consumo alimentar, redução dos níveis séricos de testosterona e aumento da concentração de MDA. Além das alterações negativas nestes marcadores clássicos de OT, o presente estudo ainda demonstrou que ocorreu atrofia do timo, órgão indicador de atividade imune [53], e a atividade da enzima mTOR (tem sua atividade aumentada como treinamento) não apresentou melhoria com o protocolo de treinamento. Embora os marcadores que tem sido classicamente considerados como indicadores de OT sejam de caráter bioquímico, neural e comportamental [51], este comportamento da mTOR sugere que variáveis moleculares podem vir a ser futuramente considerados marcadores de OT.

Apenas os parâmetros CK e cortisol não apresentaram alterações em relação ao grupo C. O fato do dano muscular mensurado pelas [CK] não apresentar diferenças entre os grupos pode ter relação, como verificou Ferraresso et al. (2012) [38] utilizando o mesmo protocolo de treinamento, com o baixo componente excêntrico deste protocolo de corrida em esteira. No tocante ao cortisol, a inexistência de diferenças entre os grupos pode ser explicada possivelmente pelo fenômeno denominado hipocortisolismo, como já observado por Halson et al. (2004) [39]. Segundos estes autores, exercícios extenuantes e crônicos podem alterar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em diversos níveis, de modo que a secreção deste hormônio possa estar reduzida em condições basais.

A utilização de carboidratos no contexto esportivo para melhora da performance é prática bem aceita e evidenciada na literatura [40–42]. Este efeito pode ser decorrente de: manutenção da glicemia [43], retardo da depleção do glicogênio muscular e hepático [40] e

recuperação mais eficiente pela maior velocidade na ressíntese de glicogênio em protocolos com mais de uma sessão diária de treino [44]. Além disso, melhora aspectos relacionados ao caráter imunológico e de estresse oxidativo do OT em atletas, como perfil hormonal menos catabólico durante e após a sessão de exercício [45], prevenção da imunossupressão [46] e redução de marcadores pró-oxidantes [47].

Embora estes efeitos ergogênicos tenham sido bem demonstrados, todos estes estudos foram de caráter agudo, ou seja, ocorreram durante uma única sessão de exercício ou em protocolos com duas sessões diárias de exercício. Estes dados não permitem extrapolação para uma possível prevenção do OT em protocolos de várias semanas de treinamento árduo. Sendo assim, embora estes dados abram a possibilidade da suplementação de carboidratos poderem atenuar ou prevenir o desenvolvimento da SOT, somente protocolos crônicos poderiam confirmar esta premissa.

Procurando sanar essa lacuna na literatura, estudos de maior duração foram conduzidos [39,48,49]. Nestes, observou-se que o carboidrato foi apenas capaz de atenuar o decréscimo da *performance* e melhorar aspectos relacionados ao humor. Ainda assim, o período de aumento da carga de exercícios desses estudos foram demasiado curtos (menores que 11 dias), não podendo extrapolar seus resultados para o contexto do OT. Dessa forma, este é o primeiro estudo em que o carboidrato foi investigado na perspectiva do efeito crônico da suplementação e com um protocolo de longa duração devidamente validado para induzir OT. Apresenta o diferencial de, além de ter investigado parâmetros de estresse oxidativo, bioquímicos e hormonais, contemplar aspectos moleculares.

A deterioração da *performance* constitui-se como principal desfecho para o atleta, sendo considerada o fator consensual para constatação do OT [50]. No presente estudo, ambos os grupos exercitados apresentaram diminuição nesta variável sem apresentar diferenças entre si ao final do protocolo. No entanto, quando consideradas apenas as diferenças intra-grupo de EX-CHO entre Pr2 e Pr3, observou-se que não houve alteração do desempenho, indicando um efeito atenuante da suplementação de carboidrato na redução da *performance*. Este achado corrobora com os resultados de estudos com humanos Achten et al. (2004) e Halson et al. (2004) [32,49], onde verificaram em corredores e ciclistas, respectivamente, que a suplementação de carboidratos foi associada à atenuação da queda de desempenho após período extenuante de treinamento físico, porém com protocolos de duração de apenas onze e oito dias respectivamente.

Outro parâmetro positivamente associado à suplementação de carboidratos foi o

consumo alimentar, posto que os animais suplementados mantiveram o consumo alimentar enquanto os não suplementados apresentaram sinais de anorexia. Decorrente de diversos aspectos do OT serem mediados pela ação de citocinas [51], é passível que o hipotálamo, centro regulador do apetite, possa interagir com essas moléculas e ter seu funcionamento alterado. Assim, a produção exacerbada de citocinas no contexto do OT poderia mediar uma resposta anoréxica em atletas “overtreinados”. Sendo este o mecanismo, os carboidratos podem ter agido reduzindo a produção de citocinas ou, de algum modo, inibido a ação destas citocinas sobre o centro regulador do apetite. Portanto, os dados do nosso estudo estimulam uma linha de investigação para determinar por quais vias a suplementação de carboidratos pode agir sobre o controle do apetite em situação de SOT.

O peso de músculos tem sido utilizado como parâmetro complementar para a constatação das repercussões metabólicas induzidas por um protocolo de exercício no crescimento muscular [38,52,53]. No estudo de Xiao, Chen e Dong (2012) e Dong et al. (2011) [52,54], utilizando o mesmo protocolo para indução de OT, observou-se inibição do crescimento muscular do gastrocnêmio. No presente estudo, a suplementação de carboidratos foi capaz de prevenir a perda de massa muscular neste músculo.

Várias variáveis que foram analisadas podem explicar o efeito protetor dos carboidratos sobre a proteólise muscular nos ratos suplementados. O maior consumo alimentar pode ter induzido a uma maior reserva de glicogênio, o que é fundamental para evitar o catabolismo principalmente em treinamento físico árduo[55]. No entanto, um dos ensaios moleculares mostrou que a atividade da enzima GS não foi afetada pelos carboidratos. Ademais, os níveis de testosterona não estiveram diminuídos no grupo EX em relação a EX-CHO, de modo que esta variável também não explica o efeito protetor dos carboidratos na massa muscular dos animais suplementados.

Por outro lado, a atividade da Akt-1 estava elevada em EX-CHO, indicando manutenção da atividade anabólica e anti-catabólica apenas neste grupo. Enquanto mTOR não foi influenciada pelos carboidratos. O fato da mTOR não se apresentar mais ativada no grupo EX-CHO, apesar da maior ativação Akt-1, pode ser explicada por dois motivos: 1) a ativação da mTOR pode ocorrer via independente da ativação pela Akt-1, decorrente do próprio estímulo contrátil do exercício [56] e 2) a ativação desta enzima aparenta ser maior em fibras do tipo IIa [57]. Uma vez que o gastrocnêmio é um músculo com fibras mistas com predominância do tipo I, constitui-se como explicação satisfatória para o achado do presente estudo.

Considerando todos estes aspectos, nosso estudo parece demonstrar que os carboidratos tem a capacidade de influenciar diretamente a atividade da enzima Akt independentemente de outros fatores anabólicos/catabólicos, como influência hormonal e atividade intramuscular relacionada a armazenamento de glicogênio.

A propósito da ausência da influência da suplementação de carboidratos na testosterona na presente investigação, estudos prévios apresentaram resultados contrastantes, com [58] ou sem [59] a manutenção dos níveis deste hormônio. Além disso, quando ocorreu melhoria da produção de testosterona, os protocolos de exercícios foram baseados em uma única sessão de exercício físico, não sendo capazes de responder como estaria o perfil hormonal anabólico (testosterona) em resposta a períodos crônicos e extenuantes de exercício.

No tocante a atividade da GS no músculo gastrocnêmio, a suplementação de carboidratos não foi capaz atenuar a sua atividade no grupo EX-CHO em relação a EX. Morifuji et al. (2011)[25] demonstraram que a suplementação com carboidratos está relacionada a maior atividade da GS e maiores estoques de glicogênio. Esta enzima apresenta atividade aumentada em decorrência, dentre outros fatores, de níveis reduzidos de glicogênio. Hipotetiza-se que nos grupos EX e EX-CHO este níveis estejam reduzidos em relação a C, como efeito natural do protocolo extenuante do treinamento na depleção dos estoques de glicogênio. Assim, pelos presentes dados, pode-se inferir que a suplementação de carboidratos não foi capaz de prevenir a depleção dos estoques de glicogênio.

O peso dos órgãos linfoides também podem ser usados para avaliação do impacto do exercício sobre a homeostase, podendo ser indicador do comprometimento no sistema imune [53]. Em condições ideais, o órgãos linfoides reagem positivamente ao estímulo da atividade física, tendo como resultado a melhora do sistema imune [60]. Entretanto, em resposta a um protocolo crônico e extenuante, esses efeitos são revertidos [51]. Já foi demonstrado na literatura, por exemplo, a possível relação de exercício físicos crônicos (16 semanas) e atrofia do timo [53], sugerindo apoptose resultante do estresse crônico. Nossos dados confirmam estas premissas, posto que o protocolo de indução de OT repercutiu negativamente sobre o timo, este apresentando-se atrofiado nos grupos EX e EX-CHO em relação ao C. Assim, a suplementação de carboidrato demonstrou-se não ser eficiente na imunocompetência, pelo menos do ponto de vista do peso deste órgão.

Exercícios intensos ou de longa duração são capazes de promover estresse oxidativo e estado pró-inflamatório [61]. Diversos estudos investigaram se a suplementação de carboidratos seria eficaz na prevenção destes fenômenos, apresentando resultados positivos

[47,62] e negativos [63,64]. No entanto, todos esses estudos basearam-se em protocolos de exercícios extenuantes de caráter agudo, não respondendo dessa maneira se em situações crônicas também haveria o provável efeito benéfico dos carboidratos. Pelos resultados obtidos no presente, a suplementação de carboidratos não é capaz de atenuar o estresse oxidativo e inflamação presentes no OT, corroborando assim com os dados de McAnult [63,64].

Tomados em conjunto, os dados do presente estudo demonstraram que a suplementação de carboidratos promove discreta atenuação na queda da performance, inibição da anorexia e aumento da massa muscular em animais submetidos a protocolo de overtraining. Este aumento da massa muscular foi acompanhado pela maior atividade do sinalizador molecular anabólico e anti-catabólico Akt-1. No entanto, aspectos negativos relacionados ao estresse oxidativo, perfil hormonal e de dano muscular não foram prevenidos por esta estratégia nutricional. Assim, a utilização de carboidratos por indivíduos engajados em programas extenuantes de atividade física demonstra ser estratégia válida para minimização dos efeitos negativos associados à SOT. Apesar de discretos, os dados deste estudo encorajam o empreendimento de estudos adicionais para avaliar a proteção dos carboidratos no OT em humanos. Neste sentido, sugere-se que se investigue como os carboidratos influenciam as concentrações séricas de citocinas para impedir a anorexia induzida pelo OT, bem como o impacto nos níveis de glicogênio hepático e muscular e se estes níveis se correlacionam com a maior atividade da enzima AKt-1, posto que parece oferecer proteção à massa muscular, como demonstrado no presente estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Lehmann M, Foster C, Dickhuth H, Gastmann U (1998) Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Med Sci Sports Exerc* 30: 1140–1145.
2. Smith L (2000) Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress. *Medicine and science in sports and exercise*. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Cytokine+Hypothesis+of+overtraining:+a+physiological+adaptation+to+excessive+stress#0>. Accessed 14 July 2013.
3. Kenttä G, Hassmén P, Raglin JS (2001) Training practices and overtraining syndrome in Swedish age-group athletes. *International journal of sports medicine* 22: 460–465. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11531041>.

4. Morgan W, Brown D (1987) Psychological monitoring of overtraining and staleness. *British Journal of ...* 21: 107–114. Available: <http://bjssportmed.com/content/21/3/107.abstract>. Accessed 16 November 2012.
5. Meeusen R, Duclos M, Gleeson M, Rietjens G, Urhausen A, et al. (2006) Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome. *European Journal of Sports Science* 6: 1–14. doi:10.1080/17461390600617717.
6. Cunha S, Ribeiro JL, Oliveira AR De (2006) Overtraining: theories, diagnosis and markers. 12: 267–271.
7. Urhausen A, Kindermann W (2002) Diagnosis of overtraining: what tools do we have? *Sports medicine* 32: 95–102. Available: <http://www.ingentaconnect.com/content/adis/smd/2002/00000032/00000002/art00002>. Accessed 16 November 2012.
8. Rogero MM, Mendes RR, Tirapegui J (2005) Aspectos Neuroendócrinos e Nutricionais em Atletas Com Overtraining. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 49.
9. Ackel-D'Elia C, Vancini RL, Castelo A, Nouailhetas VLA, Silva AC Da (2010) Absence of the predisposing factors and signs and symptoms usually associated with overreaching and overtraining in physical fitness centers. *Clinics* 65: 1161–1166. Available: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1807-59322010001100019&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322010001100019&lng=en&nrm=iso&tlng=en). Accessed 2 November 2012.
10. Armstrong L, VanHeest J (2002) The unknown mechanism of the overtraining syndrome. *Sports Medicine* 32: 185–209. Available: <http://link.springer.com/article/10.2165/00007256-200232030-00003>. Accessed 4 June 2013.
11. Margonis K, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Douroudos I, et al. (2007) Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free radical biology & medicine* 43: 901–910. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17697935>. Accessed 15 November 2012.
12. Tanskanen M, Atalay M, Uusitalo A (2010) Altered oxidative stress in overtrained athletes. *Journal of Sports Sciences* 28: 309–317. doi:10.1080/02640410903473844.
13. Kreider RB, Wilborn CD, Taylor L, Campbell B, Almada AL, et al. (2010) ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 7: 7. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2853497&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
14. Carvalho T, Rodrigues T, Meyer F (2003) Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Rev Bras Med Esporte* 15: 3–12. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Modifica??es+diet?ti>

- cas,+reposit?o+h?drica,+suplementos+alimentares+e+drogas:+comprova??o+de+a??o+ergog?nica+e+potenciais+riscos+para+a+sa?de#0. Accessed 6 December 2012.
15. SOBAL J, MARQUART LF (1994) Vitamin/mineral supplement use among athletes: a review of the literature. *Int J Sport Nutr* 4: 320–334.
  16. ANANTARAMAN R, CARMINES A, GAESSER G, WELTMAN A (1995) Effects of carbohydrate supplementation on performance during 1 hour of high-intensity exercise. *International journal of sports medicine* 16: 461–465.
  17. TSINTZAS K, WILLIAMS C (1998) Human muscle glycogen metabolism during exercise. Effect of carbohydrate supplementation. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 25: 7–23.
  18. Van Loon LJ, Saris WH, Kruijshoop M, Wagenmakers a J (2000) Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. *The American journal of clinical nutrition* 72: 106–111. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871568>.
  19. BAILEY S, HOLT C, PFLUGER K, BUDDE Z, AFERGAN D, et al. (2008) Impact of prolonged exercise in the heat and carbohydrate supplementation on performance of a virtual environment task. *Mil Med* 173: 187–192.
  20. CARTER J, JEUKENDRUP AE, MUNDEL T, JONES DA (2003) Carbohydrate supplementation improves moderate and high-intensity exercise in the heat. *Pflugers Arch* 446.
  21. WELSH R, DAVIS J, BURKE J, WILLIAMS H (2002) Carbohydrates and physical/mental performance during intermittent exercise to fatigue. *Med Sci Sports Exerc* 34: 723–731.
  22. KREIDER RB, HILL D, HORTON G, DOWNES M, SMITH S, et al. (1995) Effects of carbohydrate supplementation during intense training on dietary patterns, psychological status, and performance. *Int J Sport Nutr* 5.
  23. ANDREWS J, SEDLOCK D, FLYNN M, NAVALTA J, JI H (2003) Carbohydrate loading and supplementation in endurance-trained women runners. *J Appl Physiol* 95: 584–590.
  24. Hatfield D, Kraemer W, Volek J (2006) The effects of carbohydrate loading on repetitive jump squat power performance. *J Strength Cond Res* 20: 167–171.
  25. Morifuji M, Kanda A, Koga J, Kawanaka K, Higuchi M (2011) Preexercise ingestion of carbohydrate plus whey protein hydrolysates attenuates skeletal muscle glycogen depletion during exercise in rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 27: 833–837. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050718>. Accessed 25 July 2012.

26. Morifuji M, Kanda A, Koga J, Kawanaka K, Higuchi M (2010) Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle glycogen level in rats. *Amino acids* 38: 1109–1115. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19593593>. Accessed 10 August 2012.
27. KREIDER RB, EARNEST CP, LUNDBERG J, RASMUSSEN C, GREENWOOD M, et al. (2007) Effects of ingesting protein with various forms of carbohydrate following resistance-exercise on substrate availability and markers of anabolism, catabolism, and immunity. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 4: 18.
28. BATY JJ, HWANG H, DING Z, BERNARD JR, WANG B, et al. (2007) The effect of a carbohydrate and protein supplement on resistance exercise performance, hormonal response, and muscle damage. *Journal of strength and Conditioning Research* 21: 321–329.
29. CLOSE GL, ASHTON T, CABLE T (2006) Ascorbic acid supplementation does not attenuate post-exercise muscle soreness following muscle-damaging exercise but may delay the recovery process. *Br J Nutr* 95: 976–981.
30. FAHLSTRÖM M, FAHLSTRÖM P, LORENTZON R, HENRIKSSON-LARSÉN K (2006) Positive short-term subjective effect of sports drink supplementation during recovery. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 46: 578–584.
31. SNYDER AC, KUIPERS H, CHENG B, SERVAIS R, FRANSEN E (1995) Overtraining following intensified training with normal muscle glycogen. *Med Sci Sports Exerc* 27: 1063–1070.
32. Halson SL, Lancaster GI, Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE (2004) Effects of carbohydrate supplementation on performance and carbohydrate oxidation after intensified cycling training. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 97: 1245–1253. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155717>. Accessed 26 May 2013.
33. MERUSSE J, LAPICHIK V (1996) Instalações e equipamentos. *Manual para técnicos em bioterismo*. pp. 15–25.
34. Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Tarini V a F, Arida RM, et al. (2010) Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. *Lipids in health and disease* 9: 109. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2959201&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
35. Hohl R, Ferrareso RLP, De Oliveira RB, Lucco R, Brenzikofer R, et al. (2009) Development and characterization of an overtraining animal model. *Medicine and science in sports and exercise* 41: 1155–1163. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19346970>. Accessed 26 June 2012.

36. BRADFORD M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
37. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology (Reading, Mass)* 24: 145–149. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422008>.
38. Ferrareso RLP, Buscariolli de Oliveira R, Macedo DV, Alessandro Soares Nunes L, Brenzikofer R, et al. (2012) Interaction between Overtraining and the Interindividual Variability May (Not) Trigger Muscle Oxidative Stress and Cardiomyocyte Apoptosis in Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012: 935483. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848785>. Accessed 1 August 2012.
39. Halson SL, Lancaster GI, Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE (2004) Effects of carbohydrate supplementation on performance and carbohydrate oxidation after intensified cycling training. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 97: 1245–1253. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155717>. Accessed 26 May 2013.
40. Toone RJ, Betts J a (2010) Isocaloric carbohydrate versus carbohydrate-protein ingestion and cycling time-trial performance. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 20: 34–43. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190350>.
41. Jeukendrup AE (2004) Carbohydrate Intake During Exercise and Performance. doi:10.1016/j.nut.2004.04.017.
42. Mitchell JB (2013) Ingestion of carbohydrate during recovery in exercising people. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. doi:10.1097/MCO.0b013e328361c526.
43. Coletta A, Thompson DL, Raynor H a (2013) The influence of commercially-available carbohydrate and carbohydrate-protein supplements on endurance running performance in recreational athletes during a field trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 10: 17. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537142>. Accessed 1 April 2013.
44. Alghannam AF (2011) Carbohydrate – protein ingestion improves subsequent running capacity towards the end of a football-specific intermittent exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 757: 748–757. doi:10.1139/H11-097.
45. Gleeson M (2006) Can Nutrition Limit Exercise-Induced Immunodepression? *Nutrition reviews* 64. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1753-4887.2006.tb00195.x/abstract>. Accessed 22 August 2012.
46. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Jeffrey MG, Woods A, et al. (2011) Part one : Immune function and exercise: 6–63.

47. McAulity SR, McAulity LS, Morrow JD, Nieman DC, Owens JT, et al. (2007) Influence of carbohydrate, intense exercise, and rest intervals on hormonal and oxidative changes. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 17: 478–490. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046057>.
48. Strauss H, Sherman M (1993) Dietary carbohydrate, muscle glycogen and exercise performance during 7 d of training. *The American Journal of Clinical Nutrition*: 27–31.
49. Achten J, Halson SL, Moseley L, Rayson MP, Casey a, et al. (2004) Higher dietary carbohydrate content during intensified running training results in better maintenance of performance and mood state. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 96: 1331–1340. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660506>. Accessed 26 May 2013.
50. Duclos M, Foster C, States U (2012) Prevention, Diagnosis, and Treatment of the Overtraining Syndrome: Joint Consensus Statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*: 186–205. doi:10.1249/MSS.0b013e318279a10a.
51. Smith LL (2004) TISSUE TRAUMA: THE UNDERLYING CAUSE OF OVERTRAINING SYNDROME? *Journal of strenght and Conditioning Research* 18: 185–193.
52. Xiao W, Chen P, Dong J (2012) Eff ects of Overtraining on Skeletal Muscle Growth and Gene Expression. *Int J Sports Med* 33: 846–853.
53. Woods J a., Ceddia M a., Zack MD, Lowder TW, Lu Q (2003) Exercise training increases the naïve to memory T cell ratio in old mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 17: 384–392. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159103000308>. Accessed 20 May 2013.
54. Dong J, Chen P, Wang R, Yu D, Zhang Y, et al. (2011) NADPH oxidase: a target for the modulation of the excessive oxidase damage induced by overtraining in rat neutrophils. *International journal of biological sciences* 7: 881–891. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3149282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
55. Yan Z, Spencer M, Katz A (1992) Effect of low glycogen on glycogen synthase in human muscle during and after exercise. *Acta Physiol Scand* 145: 345–352.
56. Parkington JD, Siebert AP, LeBrasseur NK, Fielding R a (2003) Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 285: R1086–90. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881204>. Accessed 3 June 2013.
57. Deldicque L, Theisen D, Francaux M (2005) Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. *European journal of applied physiology* 94: 1–

10. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702344>. Accessed 23 May 2013.
58. De Sousa MV, Madsen K, Simões HG, Pereira RMR, Negrão CE, et al. (2010) Effects of carbohydrate supplementation on competitive runners undergoing overload training followed by a session of intermittent exercise. *European journal of applied physiology* 109: 507–516. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169359>. Accessed 1 June 2013.
59. Lane AR, Duke JW, Hackney AC (2010) Influence of dietary carbohydrate intake on the free testosterone: cortisol ratio responses to short-term intensive exercise training. *European journal of applied physiology* 108: 1125–1131. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20091182>. Accessed 26 May 2013.
60. Amaral S (2012) Efeito do exercício no sistema imune : resposta , adaptação e sinalização celular. *Revista Brasileira de Medicina do* 18: 208–214.
61. Meeusen R, Duclos M, Foster C, Fry A, Gleeson M, et al. (2013) Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Medicine and science in sports and exercise* 45: 186–205. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23247672>. Accessed 28 February 2013.
62. Scharhag J, Meyer T, Auracher M, Gabriel HH, Kindermann W (2006) Effects of graded carbohydrate supplementation on the immune response in cycling. *Medicine and science in sports and exercise* 38: 286–292. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531897>. Accessed 29 May 2013.
63. McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Utter AC, et al. (2005) Effect of resistance exercise and carbohydrate ingestion on oxidative stress. *Free radical research* 39: 1219–1224. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298748>. Accessed 28 May 2013.
64. McAnulty S, McAnulty L, Nieman D, Morrow J, Utter A, et al. (2003) Influence of Carbohydrate Ingestion on Oxidative Stress and Plasma Antioxidant Potential Following a 3 h Run. *Free Radical Research* 37: 835–840. Available: <http://www.informaworld.com/openurl?genre=article&doi=10.1080/1071576031000136559&magic=crossref||D404A21C5BB053405B1A640AFFD44AE3>. Accessed 28 May 2013.

**Tabela 1** – Protocolo de Treinamento

<b>Semana</b> <b>Experimental</b>	<b>Frases de</b> <b>Treinamento</b>	<b>Velocidade de</b> <b>Treinamento</b> <b>(m - min)</b>	<b>Tempo de</b> <b>Treinamento</b> <b>(min)</b>	<b>Número de</b> <b>sessões</b> <b>diárias</b>	<b>Recuperação</b> <b>entre sessões (h)</b>
<b>1</b>	T1	15	20	1	24
<b>2</b>	T1	20	30	1	24
<b>3</b>	T1	22,5	45	1	24
<b>4</b>	T1	25	60	1	24
<b>5 – 8</b>	T2	25	60	1	24
<b>9</b>	T2x	25	60	2	4
<b>10</b>	T3x	25	60	3	3
<b>11</b>	T4x	25	60	4	2

**Tabela 2 - Peso dos Animais e Órgãos e Gordura Peritoneal**

		<b>C</b>	<b>EX</b>	<b>EX-CHO</b>
<b>Peso</b>	g	436,7±74,9	316,0±22,4#	323,6±30,03#
<b>Gastrocnêmio</b>	g	2,06±0,27	1,67±0,06#	1,74±0,23#
<b>Gastrocnêmio/Peso</b>	mg/g	4,89± 0,27	5,32±0,36	5,39±0,48*
<b>Timo</b>	mg	0,339±0,14	0,124±0,03	0,179±0,05
<b>Timo/Peso</b>	mg/g	0,79±0,22	0,39±0,11#	0,56±0,21*
<b>Gordura Peritoneal</b>	g	30,03± 11,44	7,46± 2,89#	8,29± 3,86#
<b>Gordura Peritoneal/Peso</b>	g/g	0,06±0,01	0,02±0,0#	0,025±0,01#

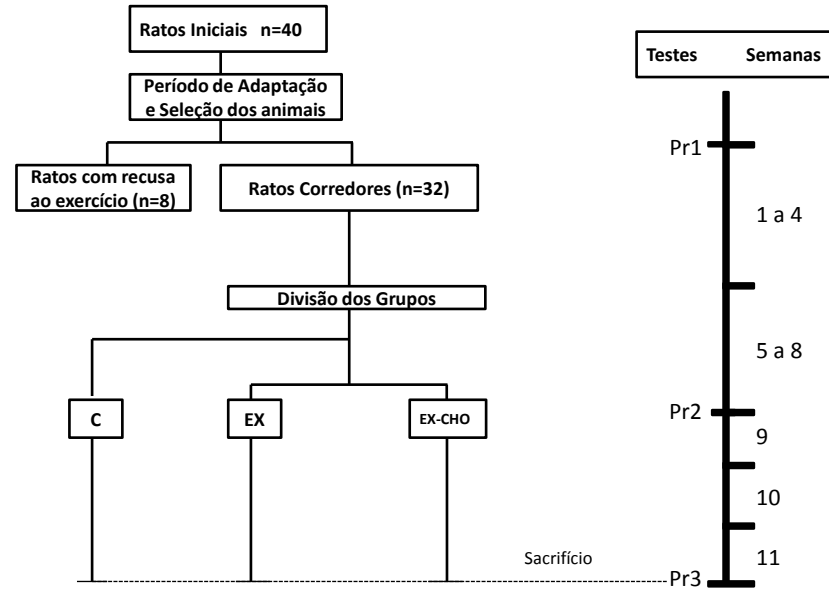
Dados estão descritos como Média ± Desvio Padrão. C: Grupo Sedentário, EX: grupo exercício sem suplementação, EX-CHO: grupo exercício + carboidrato. \*p<0,05 em relação a C; # p<0,001 em relação a C

**Tabela 3** – Análises sanguíneas

		<b>Sedentário (C)</b>	<b>Exercício (EX)</b>	<b>Exercício + Carboidrato (EX-CHO)</b>
<b>CK</b>	U/L	903,1±767	1090,7±671,1	1264±745,7
<b>Testosterona</b>	ng/mL	1,70±0,8	0,65±0,42**	0,55±0,3**
<b>Cortisol</b>	ng/mL	30,33±9,35	30,66±8,3	27,63±10,21
<b>MDA</b>	μM	0,5±0,10	0,8±0,10*	0,8±0,14*

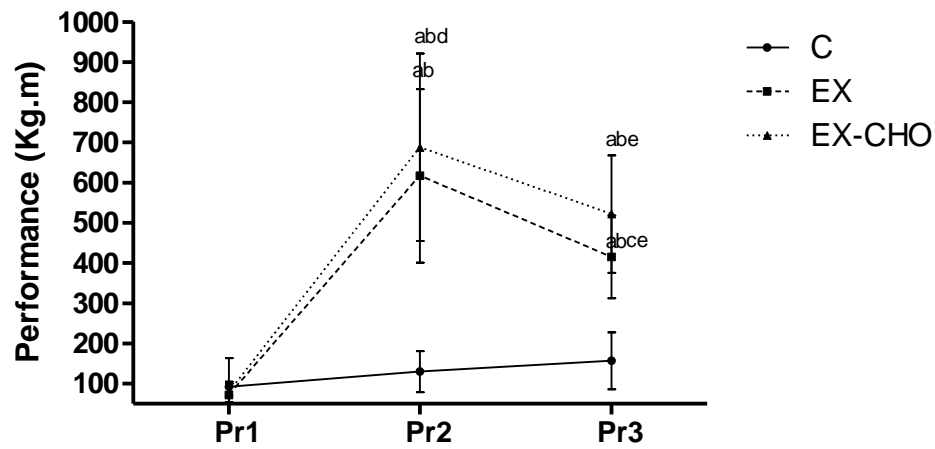
Dados estão descritos como Média ± Desvio Padrão. \* p<0,05 em relação a C; \*\* p<0,01 em relação a C.

**Figura 1** – Fluxograma dos testes de *performance* e semanas de treinamento do protocuxuolo de OT



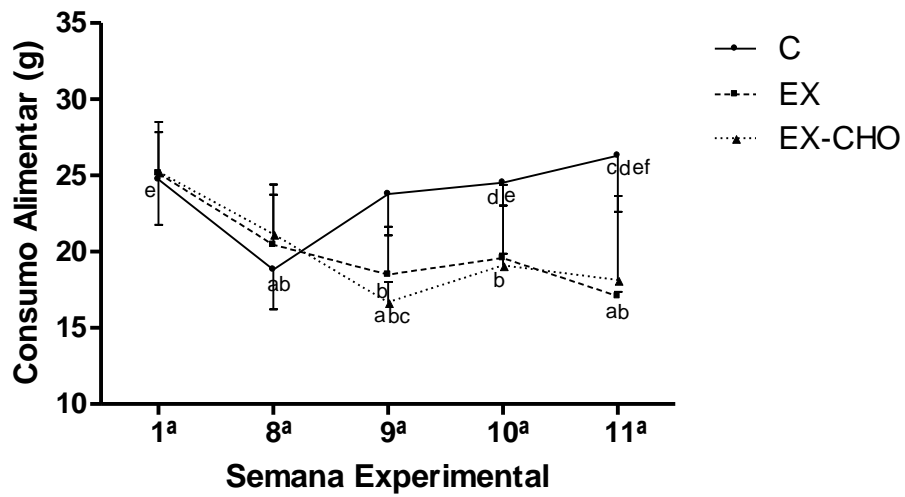
Linhas pontilhadas: sacrifício dos ratos para coleta de sangue e amostras de músculo. Pr: *Performance* dos ratos; C: grupo sedentário; EX: grupo exercício sem suplementação; EX-CHO: grupo exercício com carboidrato.

**Figura 2** – Performance de C, EX e EX-CHO nos três Pr



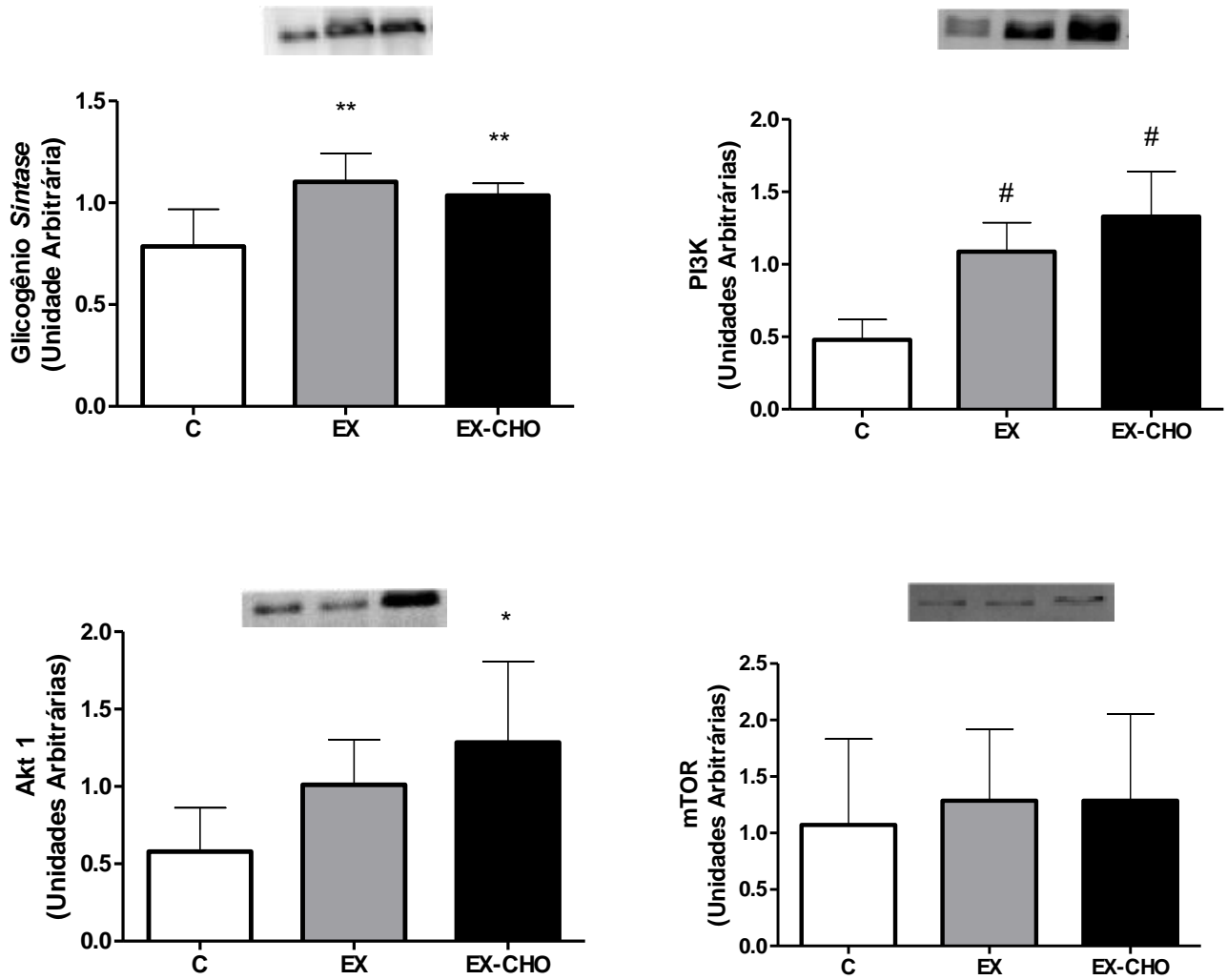
<sup>a</sup> significa  $p < 0,001$  em relação a C, EX e EX-CHO no Pr 1; <sup>b</sup> significa  $p < 0,001$  em relação a C no Pr 2 e Pr 3; <sup>c</sup> significa  $p < 0,05$  em relação a EX no Pr 2; <sup>d</sup> significa  $p < 0,001$  em relação a EX no Pr 3; e significa  $p < 0,01$  em relação a C no Pr 3.

**Figura 3** – Consumo Alimentar em C, EX e EX-CHO nas semanas do protocolo experimental.



<sup>a</sup> significa  $p < 0,05$  em relação a EX na 1<sup>a</sup>; <sup>b</sup> significa  $p < 0,05$  em relação a EX-CHO na 1<sup>a</sup>; <sup>c</sup> significa  $p < 0,05$  em relação a C na 9<sup>a</sup>; <sup>d</sup> significa  $p < 0,001$  em relação a EX-CHO na 9<sup>a</sup>; <sup>e</sup> significa  $p < 0,01$  em relação a EX na 11<sup>a</sup>; <sup>f</sup> significa  $p < 0,05$  em relação a C na 8<sup>a</sup>.

**Figura 4** – Atividade proteica de GS, PI3K, Akt1 e mTOR em C, EX e EX-CHO



Dados estão descritos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. \*  $p < 0,05$  em relação a C; \*\*  $p < 0,01$  em relação a C, #  $p < 0,001$  em relação a C.