

RENATO HIROSHI SALVIONI UETA

**EFEITO DO *OVERTRAINING* INDUZIDO
PELA ATIVIDADE FÍSICA NOS DISCOS
INTERVERTEBRAIS DE RATOS TREINADOS**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flávio Faloppa

CO – ORIENTADOR: Dra. Valquíria Pereira de Medeiros

SÃO PAULO

2011

Ueta, Renato Hiroshi Salvioni.

EFEITO DO “OVERTRAINING” INDUZIDO PELA ATIVIDADE FÍSICA NOS DISCOS INTERVERTEBRAIS DE RATOS TREINADOS./ Renato Hiroshi Salvioni Ueta. -- São Paulo, 2011.
xv,76f.

Disertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Effect of the overtraining induced by physical activity in the intervertebral discs of trained rats.

1. Disco Intervertebral. 2. Degeneração do Disco Intervertebral. 3. Corrida. 4. Condicionamento Físico Animal. 5. Ratos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM CIRURGIA PLÁSTICA

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

Dedicatória

Em primeiro lugar a **DEUS** por colocar ao meu lado, durante toda minha vida, pessoas que sempre me incentivaram a ser uma pessoa melhor, em todos os aspectos.

Aos meus pais, **CLEIDE MARIA SALVIONI UETA** e **NELSON HATIRO UETA**, por lutarem durante toda suas vidas por uma educação de qualidade para mim e meus irmãos, a quem devo todas as minhas realizações profissionais e pessoais.

À minha esposa, **BIANCA LISBOA CORSO**, pelo seu amor e dedicação, que permitiu que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível, e por carregar consigo meu sonho de ser pai.

Aos meus irmãos, **FLAVIO UETA** e **FERNANDO UETA**, por essa jornada ao meu lado e amizade de sempre.

Agradecimentos

Ao PROF. DR. **FLAVIO FALOPPA**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia EPM-UNIFESP, pela confiança e pelo incentivo para a realização deste trabalho.

Ao PROF. DR. **AKIRA ISHIDA**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia EPM-UNIFESP, pela confiança e incentivo no início deste projeto.

Ao “mestre” e amigo PROF. DR. **EDUARDO BARROS PUERTAS**, Professor Associado e Livre Docente, chefe do Grupo da Coluna do Departamento de Ortopedia e traumatologia EPM-UNIFESP, por me ensinar tudo o que sei sobre cirurgia da coluna e pelo exemplo de caráter e profissionalismo.

Ao amigo, DR. **MARCELO WAJCHENBERG**, Doutor em Ciências, pela amizade e apoio que me permitiu realizar este projeto, e pelo exemplo de competência e honestidade.

Ao amigo **DÉLIO EULÁLIO MARTINS FILHO**, Mestre em Ciências, pela amizade e pelo seu senso crítico que tanto me ajudou para a elaboração de cada etapa deste trabalho.

À minha amiga, **ROSELI PASCHOA**, por todo o apoio e confiança que depositou em mim durante toda minha vivência na Ortopedia.

À DRA. **VALQUÍRIA PEREIRA DE MEDEIROS**, pela sua enorme contribuição e ensinamentos bioquímicos que me permitiram realizar este trabalho.

Aos meus grandes amigos **CARLOS EDUARDO DA SILVEIRA FRANCIOZI, DANIEL GONÇALVES DOCA, DAVID DEL CURTO, GUSTAVO CHAVES NACIF E MARCEL JUN SUGAWARA TAMAOKI** pela verdadeira amizade de anos e pela incentivo na vida acadêmica.

Ao **VICTOR ALEXANDRE FERREIRA TARINI**, pós-graduando em nível de Doutorado, por sua paciência e colaboração para realização deste trabalho.

Aos amigos **RAFAEL LUCIANO** e **MARCIO SQUASSONI**, por me ajudarem nas minhas funções quando permaneci ausente para a realização deste trabalho.

Ao amigo **RIGEL GODINHO**, pelo companheirismo durante este período.

A todos do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da EPM-UNIFESP que, diretamente ou indiretamente, me ajudaram a realizar este trabalho.

Sumário

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo	6
2. LITERATURA	7
3. MÉTODO	20
3.1. Animais	21
3.2. Condicionamento físico e grupos	22
3.3. Extração dos glicosaminoglicanos	26
3.4. β -eliminação	27
3.5. Avaliação do comportamento	
Eletroforético dos GAGs	28

3.6. Degradação enzimática	29
3.7. Análise estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Peso dos Animais	32
4.2. Teste de desempenho	32
4.3. Peso do disco intervertebral	34
4.4. Análise da concentração de GAGs	35
4.4.1 GC	37
4.4.2 GC-Ad	38
4.4.3 OT-11sem	39
4.4.4 OT-13sem	40
4.5. Degradação enzimática das amostras	40
4.5.1 GC	42
4.5.2 GC-Ad	43
4.5.3 OT-11sem	44
4.5.4 OT-13sem	45
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS	57
8. NORMAS ADOTADAS	70

9. ABSTRACT	71
10.ANEXOS	73
11.FONTES CONSULTADAS	76

Índice de Figuras

Figura 1.	Imagem da esteira rolante utilizada no trabalho	22
Figura 2.	Disco intervertebral retirado dos animais em estudo	27
Figura 3.	Gráfico dos valores de quantificação de performance dos animais	33
Figura 4.	Gráfico da distribuição do peso dos discos	35
Figura 5.	Gráfico da distribuição da concentração de GAGs entre os grupos	36
Figura 6.	Comportamento eletroforético dos GAGs nas amostras do grupo GC	37
Figura 7.	Comportamento eletroforético dos GAGs nas amostras do grupo GC-Ad	38
Figura 8.	Comportamento eletroforético dos GAGs nas amostras do grupo OT-11sem	39
Figura 9.	Comportamento eletroforético dos GAGs nas amostras do grupo OT-13sem	40
Figura 10.	Imagem da lâmina de controle da atividade das enzimas utilizadas	41
Figura 11.	Comportamento eletroforético das amostras do grupo GC submetidas a degradação pela enzima ABC	42

Figura 12.	Comportamento eletroforético das amostras do grupo GC submetidas a degradação pela enzima AC	42
Figura 13.	Comportamento eletroforético das amostras do grupo GC-Ad submetidas a degradação pela enzima ABC	43
Figura 14.	Comportamento eletroforético das amostras do grupo GC-Ad submetidas a degradação pela enzima AC	43
Figura 15.	Comportamento eletroforético das amostras do grupo OT-11sem submetidas a degradação pela enzima ABC	44
Figura 16.	Comportamento eletroforético das amostras do grupo OT-11sem submetidas a degradação pela enzima AC	44
Figura 17.	Comportamento eletroforético das amostras do grupo OT-13sem submetidas a degradação pela enzima ABC	45
Figura 18.	comportamento eletroforético das amostras do grupo OT-13sem submetidas a degradação pela enzima AC	45

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Protocolo de treinamento de <i>overtraining</i>	25
Tabela 2.	Grupos utilizados no estudo e o número de animais	26
Tabela 3.	Distribuição do peso dos animais	32
Tabela 4.	Distribuição do peso dos discos (L5-L6 e L6-S1) entre os grupos	34
Tabela 5.	Distribuição da concentração de GAGs entre os grupos .	36

Índices de Abreviaturas e Símbolos

UNIFESP-EPM	Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo
GAG	Glicosaminoglicano
GAGs	Glicosaminoglicanos
OD	<i>Odds ratio</i>
PG	Proteoglicano
PGs	Proteoglicanos
Mpa	Megapascal
L1	Primeira vértebra lombar
L2	Segunda vértebra lombar
L5	Quinta vértebra lombar
L6	Sexta vértebra lombar
C5	Quinta vérterba cervical
T6	Sexta vértebra torácica
T12	Décima segunda vértebra torácica
S1	Primeira vértebra sacral
Km	Quilometros
m	Metros
g	Gramas
°C	Graus Celsius
min	Minutos

GC	Grupo Controle
GC-Ad	Grupo controle com treinamento adaptado
OT-11sem	Grupo <i>overtraining</i> 11 semanas
OT-13sem	Grupo <i>overtraining</i> 13 semanas
µg	Microgramas
Rpm	Rotações por minuto
M	Mol
CS	Condroitim sulfato
DS	Dermatam sulfato
HS	Heparam sulfato
Hep	Heparina
V	Volts
AC	Condroitinase AC
ABC	Condroitinase ABC
DP	Desvio padrão

Resumo

Introdução: Nas doenças degenerativas do disco intervertebral, a diminuição da concentração de glicosaminoglicanos (GAGs) mostra-se um marcador precoce. O efeito da atividade física é controverso, podendo causar danos ou proteger o disco. **Objetivo:** estudar o efeito do *overtraining*, gerado pela atividade física, nos discos intervertebrais de ratos treinados, por meio do comportamento dos GAGs. **Método:** Foram utilizados 34 ratos Wistar, dez animais não realizaram o treinamento (GC), oito foram treinados na esteira, mas não realizaram o *overtraining* (GC-Ad), oito realizaram o protocolo de *overtraining* e foram sacrificados em 48 horas (OT 11 semanas) e oito, após duas semanas (OT 13 semanas). Foram retirados os discos L5-L6 e L6-S1 e realizada análise bioquímica dos GAGs. **Resultados:** Os animais que realizaram todo protocolo de treinamento (OT 11 semanas e OT 13 semanas) atingiram o estado de *overtraining*, pois não houve melhora do seu desempenho, mesmo após cessar o treinamento. Na análise dos GAGs, notou-se diferença importante entre o grupo OT 11 semanas com os grupos OT 13 semanas e GC. Do mesmo modo, foi observada uma diferença entre os grupos GC-Ad e GC. Nas amostras dos animais submetidos ao treinamento, incluído o grupo GC-Ad, houve predominância de dermatam sulfato. **Conclusão:** O treinamento físico dos animais foi capaz de produzir efeito nos discos intervertebrais, com aumento da concentração de GAGs, e predominância da expressão de dermatam sulfato. A condição de *overtraining* não gerou resposta diferente do grupo GC-Ad, o qual não foi submetido ao protocolo completo, com concentração de GAGs reversível após duas semanas de repouso.

1. INTRODUÇÃO

A degeneração do disco intervertebral é considerada como um dos principais fatores causadores da dor lombar. Espera-se que 80% das pessoas tenham um episódio de lombalgia durante a vida e estima-se que seja a segunda razão mais frequente de consultas médicas, gerando um custo superior a 90 bilhões de dólares ao ano para o sistema de saúde e previdenciário, segundo dados dos EUA (Luo, Pietrobon *et al.*, 2004).

O disco intervertebral consiste em duas porções distintas e interdependentes, o núcleo pulposo, gelatinoso e rico em proteoglicanos e o ânulo fibroso, um tecido formado por lâminas concêntricas ricas em colágeno. Essas estruturas são responsáveis pela absorção de carga e resistência à força compressiva, tênsil e torcional, tendo como componentes principais da matriz extracelular os proteoglicanos e o colágeno (Scott, Bosworth *et al.*, 1994; Cs-Szabo, Ragasa-San Juan *et al.*, 2002; Korecki, Kuo *et al.*, 2009; Singh, Masuda *et al.*, 2009).

Duas classes de proteoglicanos estão presentes no disco intervertebral, o de alto peso molecular - agrecam e versicam, e de baixo peso molecular - biglicam, decorim, fibromodulina e lumicam. Os proteoglicanos de alto peso molecular são acrescidos por inúmeros glicosaminoglicanos carregados negativamente, responsáveis pela capacidade de ligação com a água. A família dos proteoglicanos de baixo peso molecular é caracterizada por proteínas de núcleo ricas em leucina acrescidas por cadeias de glicosaminoglicanos, e presentes no disco imaturo e tecidos de reparação (Hardingham e Adams, 1976; Johnstone,

Markopoulos *et al.*, 1993; Melrose, Ghosh *et al.*, 1997; Roughley, 2004; Bouças, Trindade *et al.*, 2008).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares formados por unidades dissacarídicas constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) unidas por uma ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou um açúcar neutro (D-galactose). A maioria desses compostos apresenta grupamentos sulfatos, que juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos, conferem alta densidade de cargas negativas. São conhecidos os seguintes glicosaminoglicanos: heparina, heparam sulfato, condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico (Bouças, Trindade *et al.*, 2008).

Como alteração precoce do processo degenerativo do disco, observa-se a quebra da função agregadora dos proteoglicanos, reduzindo a concentração de glicosaminoglicanos sulfatados no interior do núcleo pulposo (Sztrolovics, Alini *et al.*, 1999; Yerramalli, Chou *et al.*, 2007; Beckstein, Sen *et al.*, 2008; Boxberger, Auerbach *et al.*, 2008; Boxberger, Orlansky *et al.*, 2009; Wuertz, Godburn *et al.*, 2009). Essa redução tem impacto na função mecânica do disco, alterando a capacidade de absorver e reter água. A pressão dentro do núcleo é reduzida, com a resistência mecânica do núcleo e de todo o segmento vertebral, alterada.

A redução experimental de GAGs dentro do núcleo pulposo não é um conceito novo. Estudos em animais mostram que a degradação do GAG, seja por quimionucleólise ou por lesão direta por agulha, promove alteração do comportamento mecânico do disco intervertebral, provocando

maior deformação sob carga fisiológica (Boxberger, Sen *et al.*, 2006; Boxberger, Auerbach *et al.*, 2008; Elliott, Yerramalli *et al.*, 2008; Han, Zhu *et al.*, 2008; Hsieh, Hwang *et al.*, 2009). Isso ocorre devido à diminuição da pressão hidrostática dentro do disco intervertebral.

Certas condições mecânicas podem causar danos ao disco relativamente saudável e indolor (Stokes e Iatridis, 2004) e estudos associam o excesso de carga axial durante à atividade física ao processo degenerativo (White e Malone, 1990). Por outro lado, o sedentarismo é fator causador desse processo, principalmente nas mulheres. Nos animais de pequeno porte e quadrúpedes, a carga axial na coluna vertebral é menor do que a dos bípedes. Liang *et al.* (2008) mostraram que o estímulo da postura bípede nesses animais aumenta a velocidade de degeneração do disco. Contudo, as consequências da prática de exercícios de alta intensidade ou extremamente prolongados, não estão plenamente esclarecidos.

Concomitante ao aumento de desportistas em nível competitivo, notou-se um aumento na frequência de relatos de casos de *overtraining* (Brenner e Fitness, 2007; Meeusen, Nederhof *et al.*, 2010). Segundo o Colégio Europeu de Ciências Esportivas, o *overtraining* é considerado um processo contínuo de intensificação de treinamento, no qual há uma perda do rendimento, sem o retorno aos níveis normais após o período habitual de repouso, podendo perdurar por semanas ou meses. Vários estudos têm descrito alterações inflamatórias, comportamentais, e imunológicas, associadas à este quadro (Hohl, Ferrarresso *et al.*, 2009; Meeusen, Nederhof *et al.*, 2010).

Estudos relacionam o treinamento físico em nível competitivo às doenças na coluna vertebral (Ferrell, 1999; Jones, Stratton *et al.*, 2007; Hangai, Kaneoka *et al.*, 2010); muitos destes estão relacionados às doenças do componente ósseo da coluna, como a espondilólise (Soler e Calderón, 2000; Hangai, Kaneoka *et al.*, 2010); no entanto poucos estudos relacionam a prática esportiva em alta demanda à doença do disco intervertebral (Kibler, Chandler *et al.*, 1992; Strowbridge, 2005; Hangai, Kaneoka *et al.*, 2009).

Considerando que certos modelos experimentais são inviáveis de serem aplicados em seres humanos por oferecerem potenciais riscos à saúde, os modelos animais de treinamento físico, permitem testar hipóteses antes impossíveis, como o *overtraining*, os exercícios exaustivos, e outros (Holm e Nachemson, 1983; Säämänen, Puustjärvi *et al.*, 1993; Puustjärvi, Lammi *et al.*, 1994; Hohl, Ferraresso *et al.*, 2009; Brisby, Wei *et al.*, 2010; Meeusen, Nederhof *et al.*, 2010).

Na Linha de Pesquisa que estamos inseridos, outros protocolos de atividade física de animais estão em andamento, como o *ultra-endurance*. Ademais, nenhum estudo até então investigou as consequências da condição de *overtraining* sobre o disco intervertebral.

O presente estudo tem por objetivo verificar o efeito do *overtraining* induzido pelo exercício físico sobre o disco intervertebral de ratos treinados.

1.1 Objetivo

Verificar o efeito do estado de *overtraining* induzido pelo exercício físico sobre o disco intervertebral de ratos treinados, por meio da análise bioquímica dos glicosaminoglicanos.

2. LITERATURA

Strowbridge (2005) estudou as diferentes causas de dor lombar baixa, entre os diferentes sexos, na população militar britânica, submetida a alto nível de atividade física e esportiva. Dos militares encaminhados para o serviço médico de referência, 17,8% eram de novos casos de lombalgia. O estudo demonstrou maior incidência de dor lombar baixa nas militares do sexo feminino (OR 3,17). As mulheres foram mais susceptíveis a dor lombar em razão do treinamento físico, sua ocupação e atividades extra militar. Em relação à atividade esportiva, a incidência de dor lombar em homens e mulheres foram semelhantes.

Villavicencio, Burneikiene *et al.* (2006) estudaram a epidemiologia da dor lombar e cervical nos triatletas, com o objetivo de avaliar a prevalência da dor discogênica e identificar os fatores de risco. Foram utilizados questionários para obtenção de dados em relação a dor à atividade física. Neste estudo, a incidência da dor lombar foi de 67,8%, sendo que 23,7%, provavelmente, de origem discogênica. O evento com maior associação a dor lombar foram as lesões prévias ligadas à prática esportiva nos pacientes que apresentaram dor. Os dois maiores fatores de risco associado a dor lombar foram as lesões relacionadas ao esporte e a atividade física em excesso.

Hangai, Kaneoka *et al.* (2009) estudaram a associação entre a degeneração do disco intervertebral e atividade esportiva. Para isso, eles utilizaram como parâmetro o exame de ressonância magnética e questionário de dor lombar. No estudo foram avaliados 308 atletas universitários, jogadores de futebol, beisebol, futebol americano, corredores, nadadores e praticantes de kendo, e 71 não atletas (grupo referência). Observaram maior incidência de dor lombar nos jogadores de beisebol (OR 3,23) e nos nadadores (OR 2,95), em relação aos não atletas. Observaram que pacientes com exame caracterizando degeneração do disco intervertebral, apresentavam maior quantidade de episódios de dor lombar com referência ao questionário de dor. Os autores concluem que a prática competitiva de beisebol e natação relacionam-se a degeneração do disco intervertebral. Concluem também que a dor lombar intensa é um fator preditor de alterações degenerativas do disco.

Hangai, Kaneoka *et al.* (2010) estudaram a prevalência de dor lombar nos jovens, praticantes de atividades esportivas em diferentes níveis. Nos jovens com alta carga de atividade esportiva a incidência de dor lombar foi de 71,7%, enquanto nos de baixa carga foi de 50,0%. Destes, 9,6% e 4,4%, respectivamente, faltaram às atividades escolares em razão da dor lombar. Concluem que a atividade esportiva competitiva durante a infância está associada a dor lombar.

Robson (2003) estudou a expressão da interleucina-6 nos atletas que apresentaram a condição de *overtraining*. Observou aumento da expressão dessa citocina nos pacientes.

Petibois *et al.* (2003) estudaram os aspectos bioquímicos da condição de *overtraining*; observaram a alteração do metabolismo de carboidratos e lipídios, levando a alteração da síntese de ácidos graxos.

Budgett, Hiscock *et al.* (2010) avaliaram a atividade de neurotransmissores (5-hidroxitriptamina) nos atletas que apresentaram a condição de *overtraining*. Notaram que houve aumento na sensibilidade dos receptores deste neurotransmissor, comparados com os atletas que mantiveram seu rendimento.

Hohl, Ferraresso *et al.* (2009) validaram o modelo animal, em rato, para a indução da condição de *overtraining*, gerado pela atividade física. Para sua caracterização utilizaram a dosagem da glutamina e do glutamato e a quantificação dos testes de desempenho dos animais.

Lahaye *et al.* (2010) utilizaram o protocolo de oito semanas de treinamento dos animais, chegando a velocidade de 25 m/min, com 60 minutos por sessão, cinco vezes por semana, sendo avaliado a atividade dos β -adrenoceptores em ratos diabéticos.

Wang, Wisloff *et al.* (2010) avaliaram diversos modelos animais de condicionamento físico para avaliação de hipertrofia cardíaca. Citam os

protocolos de ratos e camundongos submetidos a treinamento em esteira, na roda e natação. Todos modelos geraram hipertrofia.

Faul, Jim *et al.* (2011) estudaram o efeito da atividade física no período pré-quimioterápico de pacientes em tratamento de câncer. Os pacientes que realizaram o treinamento apresentaram melhores índices de qualidade de vida e saúde mental.

Imayama, Alfano *et al.* (2011) realizaram estudo avaliando o efeito do exercício físico regular na qualidade de vida de homens e mulheres submetidos a uma carga de 360 horas, comparando-os com grupo controle. Nesse estudo observou-se que ocorreu melhora nos quesitos de vida social, vitalidade e saúde mental nos homens que realizaram o treinamento físico.

Chen e Rimmer (2011) realizaram uma metanálise para avaliar os efeitos da atividade física nos pacientes infartados, utilizando oito estudos, e concluem que a atividade física gerou uma melhora nos índices de qualidade de vida desses pacientes.

Olczyk (1993) descreveu a diminuição da concentração de glicosaminoglicano no núcleo pulposo dos discos prolapsados de humanos. Sugeriu que essa diminuição está relacionada ao envelhecimento do disco intervertebral.

Kiviranta *et al.* (1994) estudaram o comportamento dos GAGs e da espessura da cartilagem articular de joelhos de cachorros submetidos a imobilização ou não. Observaram que quando submetidos a imobilização por 11 semanas, aferiu-se diminuição da concentração de GAGs e da espessura da cartilagem. No entanto estes valores foram muito semelhantes aos das articulações não imobilizadas, após 15 semanas de mobilização das mesmas.

Singh, Masuda *et al.* (2009) analisaram as mudanças ocorridas na matriz extracelular do disco intervertebral de humanos, causadas pelo envelhecimento. A concentração total de proteoglicano (medido pela concentração total de GAG pelo azul de dimetilmetileno – DMMB), assim como a concentração de colágeno, diminuiu com a idade.

Hiyama, Gajghate *et al.* (2009) descreveu estudo que demonstrou que as células do disco intervertebral são capazes de regular a atividade osmótica e a capacidade de absorção de carga, por meio da autoregulação da síntese de GAG pela expressão Glucuronosiltransferase-I (GlcAT-I).

Butler e Wels (1971) realizaram estudo em animais, analisando a composição química do disco intervertebral de gatos. Encontraram grande concentração de dermatam sulfato e condroitim sulfato nessa estrutura. Notaram que a presença de água no interior do disco estava relacionada a concentração desses glicosaminoglicanos.

Melrose, Ghosh *et al.*(1997) estudaram a resposta do disco intervertebral na lesão externa (punção com agulha) no disco de ovelhas. No grupo em que foi realizada a punção, houve aumento na concentração de proteoglicanos ricos em dermatam sulfato (decorim e biglicam) comparados com o grupo sem lesão. Concluem que o aumento da concentração desses PGs, principalmente o biglicam, é uma resposta à lesão gerada no disco intervertebral.

Elliott e Sarver (2004) validaram o modelo animal em ratos para o estudo biomecânico e anatômico do disco intervertebral. Referem que a região lombar do disco é a mais propícia ao estudo biomecânico do disco.

O'connell, Vresilovic *et al.* (2007) estudaram as características biomecânicas dos discos intervertebrais de diferentes animais em relação ao disco intervertebrais humano. Concluem que a altura do disco, a largura e a área do núcleo pulposo dos disco intervertebrais da coluna lombar e da cauda dos ratos foi a que mais se assemelhou aos humanos.

Boxberger, Sen *et al.* (2006) estudaram a relação entre o glicosaminoglicanos e a mobilidade dos segmentos lombares da coluna dos ratos. Para isso, diversos segmentos vertebrais foram tratados com doses variáveis de condroitinase-ABC (para degradação dos glicosaminoglicanos) e submetidos a ciclos de tensão e compressão. Observaram relação entre a quantidade de glicosaminoglicanos no interior do núcleo pulposo do disco intervertebral e a alteração no arco de

movimento do segmento. Concluem que o decréscimo da quantidade de glicosaminoglicanos, compatível com os estágios iniciais da degeneração do disco intervertebral humano, afetou a função mecânica do disco, e essas alterações podem gerar o início da cascata degenerativa do disco intervertebral.

Macias, Cao *et al.* (2007) realizaram estudo em humanos, simulando situação de microgravidade. Mantiveram os pacientes em posição supina com 6° de inclinação e, por meio de um aparato especial, proveram atividade física nesses indivíduos. Ao realizar tais atividades, o disco intervertebral, mesmo na ausência da força gravitacional com orientação axial no eixo da coluna, foi capaz de gerar compressão no disco intervertebral, por meio da grande contração dos músculos eretores da coluna vertebral.

Liang, Zhou *et al.* (2008) estudaram o efeito da postura ereta nos discos intervertebrais lombares de ratos. Foram submetidos a amputação das suas patas anteriores e forçados a atitude bípede. Os animais foram sacrificados cinco, sete e nove meses após a cirurgia. O estudo histológico demonstrou alterações degenerativas no disco intervertebral como desorganização na estrutura do colágeno nas placas terminais, fragmentação do ânulo fibroso e diminuição da altura do disco. Na análise imunohistoquímica, mostrou uma diminuição no nível protéico de colágeno tipo II. Concluem que a manutenção da postura ereta por tempo prolongado nos ratos acelerou o processo degenerativo nos discos intervertebrais.

Iatridis, Setton *et al.* (1997) estudaram o comportamento mecânico do núcleo pulposo do disco intervertebral humanos em diferentes estágios de degeneração. Os segmentos vertebrais foram submetidos a cargas de cisalhamento e o comportamento do núcleo foi avaliado. Notaram que com a degeneração, a capacidade de dissipação da carga axial pelo núcleo pulposo diminui. Concluem que o disco intervertebral degenerado, transformou-se de comportamento viscoelástico para o de uma estrutura sólida.

Elliott e Sarver (2004) estudaram o comportamento do disco intervertebral de ratos, comparando-os com o disco humano. Avaliaram o comportamento do disco intervertebral sobre carga axial e torsional, e em relação à carga axial, a rigidez do disco do rato foi de 2 – 4 MPa, enquanto do humano foi de 3 – 9 MPa. Quanto à rigidez da tensão do disco do rato e do humano foram semelhantes (5 -11 MPa e 2 – 9 MPa, respectivamente). Concluem que o modelo animal em rato, foi biomecanicamente válido para o estudo do disco intervertebral.

Melrose, Ghosh *et al.* (2001) analisaram a composição do disco intervertebral de ovinos. Observaram predominância de versicam e decorims na região do ânulo fibroso. Os biglicanos foram abundantes em todas as regiões do disco fetal e no animal adulto apresentou-se com menor frequência na região do ânulo fibroso, mas foi presente no núcleo pulposo.

Scott, Bosworth *et al.* (1994) analisaram o conteúdo de glicosaminoglicanos no interior do disco intervertebral de humanos em diferentes idades e localizações. A concentração de colágeno foi maior na região cervical e menor na lombar, enquanto que a concentração de glicosaminoglicanos foi maior na região lombar, isso porque a região lombar foi mais submetida a cargas axiais e a região cervical a cargas rotacionais. Essa diferença foi observada nos fetos e nos adultos. Com relação à idade, a concentração de colágeno no ânulo fibroso foi maior nos adultos e crianças e menor, nos neonatos. Observou-se uma diminuição da quantidade de poliânions (em especial o condroitim) com o avanço da idade. Essa diminuição foi substancial no ânulo fibroso em toda a coluna, e acentuada no núcleo pulposo da coluna lombar dos adultos em relação às crianças e neonatos. Essa diminuição de condroitin está relacionada a diminuição de concentração de água nesses locais. Com relação ao balanço condroitin/keratan sulfato, notou-se um aumento na concentração de keratan sulfato, que igualmente na cartilagem articular e córnea foi regulado pela tensão de oxigênio, menor nos adultos.

Holm e Nachemson (1983) avaliaram as alterações causadas pelo exercício no disco intervertebral de cachorros. Notaram um aumento do metabolismo aeróbico no núcleo pulposo e na região mais externa do ânulo fibroso, percebido pela diminuição da concentração de lactato. Concluem que a movimentação da coluna vertebral durante período prolongado, levou a variação positiva da nutrição do disco.

Säämänen, Tammi *et al.* (1990) avaliaram a cartilagem de joelho de cachorros, submetidos por período de imobilização. Notaram que a quantidade de PGs no seu interior foi menor que no grupo controle, sugerindo que o contato (movimentação) entre as cartilagens do joelho mantém os níveis de PGs na cartilagem.

Säämänen, Puustjärvi *et al.* (1993) estudaram os disco intervertebrais de L1-L2 de animais (cães da raça Beagle), submetidos a um treinamento de 20 km/dia durante 15 semanas, com inclinação de 15 graus. Não encontraram alterações estatisticamente significante nas concentrações de colágeno e proteoglicanos no núcleo pulposo dos discos intervertebrais. Em relação ao ânulo fibroso, observaram aumento da concentração de colágeno, enquanto que nos proteoglicanos não se alterou. Concluem que essa alteração na razão proteoglicano/colágeno no ânulo fibroso reflete uma modificação das propriedades mecânicas do disco e adaptação do tecido à atividade física.

Puustjärvi, Lammi *et al.* (1994) avaliaram os proteoglicanos no disco intervertebral de cachorros após estenuante treinamento de corrida. Foram avaliados 20 cachorros da raça Beagle (dez treinados e dez controles), submetidos ao treino de um ano, com 40 km/dia. Após o treinamento foram avaliados os discos cervicais (C5) e torácicos (T6 e T12). Observaram que no ânulo fibroso de T6, a concentração de proteoglicanos diminuiu nos animais treinados, apesar do nível de dermatam sulfato serem maiores, comparados ao controle. O estudo demonstrou que o aumento na carga exercida na coluna vertebral (através da atividade física) causou alterações

específicas em relação a produção dos proteoglicanos, sugerindo uma alteração nas funções biomecânicas do disco intervertebral nesses animais.

Wuertz, Godburn *et al.* (2009) estudaram o comportamento do disco intervertebral da cauda de ratos, submetidos à carga axial gerada por fixador externo cirurgicamente implantado. Os animais foram divididos em grupo controle, grupo com duas e oito semanas de experimento. Nesse estudo foi observado no grupo de duas semanas um processo de remodelação da matriz extracelular, principalmente na produção de glicosaminoglicanos (analisados pelo DMMB), sem sinais de alterações degenerativas. No entanto, no grupo com oito semanas, a quantidade de GAGs manteve-se elevada mas com discretas alterações na altura do disco intervertebral. Concluem que a carga axial, sem excessos, pode ser benéfica ao disco.

Brisby, Wei *et al.* (2010) avaliaram os efeitos do exercício de corrida na produção das matrizes extracelulares nos discos intervertebrais de ratos. Estudaram 12 animais, com seis deles submetidos ao treinamento em esteira por três semana, por cinco dias por semana, por uma hora, com velocidade de 17 m/min na esteira. Após o treinamento, os animais foram sacrificados e realizou-se análise histológica dos discos intervertebrais. O número de células no ânulo fibroso aumentou em 25% nos animais treinados, assim como, observou-se aumento na expressão de colágeno tipo II, agrecanos e da proteína Cox-9 no ânulo fibroso e no núcleo pulposo. Não foi observado aumento na taxa de apoptose celular, sugerindo que a

atividade física regular pode ter um efeito positivo na produção de celular e de matriz.

3. MÉTODO

3.1. Animais

Foram utilizados 34 ratos machos albinos da raça Wistar, adultos, pesando entre 200 e 280 gramas no início dos experimentos. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UNIFESP - Escola Paulista de Medicina, e mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Renal durante todo o período experimental. Os animais foram alojados em grupos de até seis ratos, em gaiolas apropriadas, onde tinham livre acesso a água e comida. As condições do nosso biotério obedeceram a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro: 07:00-19:00), com temperatura ambiente constante entre 21 e 22°C.

Os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UNIFESP - EPM foram adotados e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - Hospital São Paulo, sob o número CEP 0251/10.

3.2. Condicionamento Físico e Grupos Experimentais

A familiarização com o ergômetro, determinação da treinabilidade e o programa de treinamento físico foram realizados em esteira rolante de seis pistas modelo AVS (AVS Projetos, São Paulo, Brasil).

Figura 1: Imagem da esteira rolante utilizada no trabalho, modelo AVS (AVS Projetos, São Paulo, Brasil).



Para determinar a medida de treinabilidade dos animais, uma escala de desempenho na esteira de um a cinco, classificada por Dishman, Armstrong *et al.* (1988) foi realizada, 1= o animal se recusa a correr, 2= corrida sem constância (corre e pára ou corre em direção errada), 3= corrida regular, 4= corrida boa (ocasionalmente corre na parte de trás da esteira), 5= corrida excelente (corre permanentemente na parte da frente da

esteira). Os animais com classificação de “3” ou mais foram incluídos no estudo.

Os animais treinados foram submetidos a 11 semanas de treinamento do protocolo adaptado de Hohl *et al.*(2009), descrito na tabela 1. A semana de treinamento consiste em cinco dias consecutivos de treinamento seguido de dois dias de descanso dos animais.

A primeira parte da fase adaptativa do treino, quatro primeiras semanas, tem como objetivo aumentar a aptidão do animal para a corrida, com aumento progressivo da velocidade da esteira e do tempo de treinamento.

No momento seguinte, segunda parte da fase adaptativa, que consiste na manutenção dos parâmetros máximos, obtidos da fase anterior, por mais de quatro semanas para manter o animal totalmente adaptado a carga de treinamento.

Nas últimas três semanas de treinamento a frequência de exercícios diários foi aumentada para duas, três e quatro vezes a carga de treinamento atingida na fase anterior. O tempo de recuperação também foi reduzido entre as sessões de treino (quatro, três e duas horas, respectivamente) para causar um desequilíbrio entre sobrecarga e recuperação. Todos os animais foram treinados no período da noite, a partir das 19:00 horas, respeitando a característica notívaga dos animais.

Durante a fase de treinamento de 11 semanas foram realizados seis testes de desempenho dos animais, e após o treinamento foram realizados outros dois testes, uma e duas semanas após o término do treinamento. Os testes foram realizados 60 horas após a última sessão de treino na semana.

Os animais iniciaram o teste correndo na esteira, sem inclinação, com velocidade de 12 metros por minuto. A cada dois minutos a velocidade foi aumentada em um metro por minuto, até chegar na velocidade de 20 metros por minuto. Logo após, o aumento da velocidade foi de dois metros por minuto a cada três minutos até o animal chegar a exaustão. Consideramos com condição de exaustão, o momento que o animal tocou pela décima vez em um minuto a grade metálica no fim da esteira (choque), o que foi então quantificado o desempenho dos animais pela fórmula:

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

Sendo que:

Pr representa o desempenho do animal. Pri é o desempenho dos animais em cada estágio, m é a massa (peso do animal), Vi é a velocidade do estágio, Ti é o tempo de corrida no estágio, Di é a distância percorrida no estágio e D é a distância total percorrida pelo animal durante o teste. Pr é expressada em quilogramas-metro (Kg.m) (tabela 1).

Tabela 1: Protocolo de treinamento de *overtraining* dos animais deste estudo, em metros por minutos (m/min), minutos (min) e horas (h) (Hohl, Ferrarresso *et al.*, 2009).

Semana de treinamento	Velocidade da esteira (m/min)	Tempo de treinamento por sessão (min)	Número de sessões diárias	Repouso entre as sessões (h)
1	15	20	1	24
2	20	30	1	24
3	22.5	45	1	24
4	25	60	1	24
5 – 8	25	60	1	24
9	25	60	2	4
10	25	60	3	3
11	25	60	4	2

Os animais foram divididos em dois grupos principais: Grupo *overtraining* (OT) e Grupo Controle (GC). Dentro desses grupos maiores os animais foram divididos em dois subgrupos. Metade do grupo OT (n=8) foi sacrificada 48 horas após o último teste, sendo chamado de OT-11sem. A outra metade do grupo OT (n=8), foi sacrificada após duas semanas, cumprindo todos os testes de desempenho, sendo chamado de OT-13sem.

O Grupo Controle foi dividido em dois grupos, o Grupo Controle Não Treinado (GC), em que os animais não realizaram qualquer tipo de treinamento, e foram sacrificados ao atingirem a idade equivalente à idade

dos demais animais do estudo. Grupo controle com Treinamento Adaptado (GC-Ad), no qual os animais realizaram o treinamento físico até a fase adaptativa (oito semanas), e foram sacrificados 48 horas após a última sessão de treino (tabela 2).

Tabela 2: Distribuição do número de animais nos Grupos de estudo.

Grupo	Grupo	Nº de animais
Grupo Controle (GC)	GC	10
	GC-Ad	8
Grupo <i>Overtraining</i> (OT)	OT-11sem	8
	OT-13sem	8

3.3. Extração dos Glicosaminoglicanos Sulfatados do Disco Intervertebral

Após o sacrifício dos animais, a coluna lombar foi ressecada em bloco. O material correspondente ao disco intervertebral de L5-L6 e L6-S1 foi retirado por meio de dissecação cuidadosa. O material coletado dos animais dos grupos GT e GC foram pesados e lavados em tampão fosfato salino (PBS) em presença de inibidores de protease e mantidos a 4°C para posterior procedimento de extração dos glicosaminoglicanos sulfatados (figura 2).



Figura 2: Disco intervertebral retirado dos animais em estudo

Inicialmente as amostras foram fragmentadas em presença de PBS com temperatura ambiente. Os fragmentos obtidos foram submetidos à digestão com protease (papaína) na concentração 1mg/ml da enzima no tampão fosfato cisteína pH 6,5 para cada 100 μ g do tecido a 60°C *overnight*. Os glicosaminoglicanos obtidos foram precipitados pela adição de metanol e armazenados a -20°C *overnight*. Após esse período as amostras foram obtidas pela centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C.

3.4. β -eliminação

As amostras obtidas foram submetidas ao processo de β -eliminação para fragmentação do core-proteico/peptídeo por boridreto de sódio 1M e NaOH 0,05M.

As amostras foram encubadas com boridreto de sódio 0,05M NaOH/1M *overnight* em temperatura ambiente. Após esse período a reação foi neutralizada pela adição de ácido acético 10% e submetidas à diálise contra água destilada por 4 horas a 4°C. As amostras foram secas na bomba a vácuo (*speed vac*), pesadas e submetidas a análise eletroforética.

3.5. Avaliação do Comportamento Eletroforético dos Glicosaminoglicanos do Disco Intervertebral

A análise das amostras por eletroforese em gel de agarose determinou a identificação e a quantificação dos glicosaminoglicanos, separando-os de acordo com o tampão utilizado. O tampão PDA (1,3-diaminopropano acetato) 0,05M, pH 9,0 distingue os compostos conforme a interação diferencial (por carga) com a diamina presente no tampão, discriminando, por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, os condroitim sulfatos (CS), dermatam sulfatos (DS), heparam sulfatos (HS) e heparinas (HEP). Assim, a heparina foi o composto que mais interagiu com a diamina.

Para a realização da corrida eletroforética aproximadamente 5µL de cada amostra foi aplicada no gel de agarose a 0,55%, com espessura de 0,2cm, preparada em tampão 0,05M, pH 9,0. Após a aplicação, as amostras foram submetidas a corrente elétrica (5V/cm) durante um hora em caixa refrigerada a 4°C. Como padrão de corrida eletroforética uma mistura de GAGs (CS, DS, HS) de concentração conhecida também foi aplicada ao gel

de agarose e submetidas às mesmas condições. Como estes compostos possuem carga aniônica, a origem do gel corresponde ao pólo negativo.

Após a corrida eletroforética, os glicosaminoglicanos foram precipitados no gel através da imersão em uma solução de CETAVLON 0,1% por 2 horas. Posteriormente, o gel foi seco sob uma corrente de ar quente e a seguir corado com uma solução de azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%. O excesso de corante foi removido com a mesma solução sem o corante. O gel secou à temperatura ambiente. Após esse procedimento os glicosaminoglicanos foram quantificados por densitometria.

3.6. Degradação enzimática

As amostras foram então incubadas a 37° C com condroitinase AC e ABC e submetidas a nova corrida eletroforética (conforme descrito anteriormente) para caracterização do tipo de GAG contidas nas alíquotas estudadas, na qual a enzima condroitinase AC degrada o condroitim e heparan sulfato, preservando o dermatam sulfato e a enzima condroitinase ABC que degrada o dermatam e o condroitim sulfato.

3.7. Análise estatística

Nesse estudo foi utilizado o teste de normalidade de distribuições (teste de Kolmogorov-Smirnov) nas variáveis estudadas, sendo que não houve fuga de normalidade na distribuição ($p > 0,05$). Para comparação dos resultados entre os grupos foram utilizados análises de variâncias (ANOVA), seguido de comparações múltiplas de Bonferroni, para comparação dos grupos, dois a dois, quando necessário (Kirkwood, Sterne, 2006). Foram considerados significativos valores $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Peso dos animais

Ao analisarmos o comportamento dos animais durante o estudo avaliamos a distribuição do peso destes animais entre os grupos (tabela 3).

Tabela 3: Distribuição do peso dos animais (em Kg) entre os grupos, segundo a média, desvio padrão (DP), número de animais (N) e valor p .

Variável	Grupo	Média	DP	N	p
Peso do animal (Kg)	OT-11sem	0,257	0,018	8	0,054
	OT-13sem	0,253	0,011	8	
	GC	0,294	0,061	10	
	GC-Ad	0,253	0,017	8	

$p < 0,05$

Não foi observado diferenças entre o peso dos animais distribuídos entre os grupos.

4.2. Teste de desempenho

O cálculo da quantificação do desempenho dos animais que realizaram o treinamento (GT-13sem), para caracterizar o estado de *overtraining* dos

animais em estudo (figura 3), segundo a fórmula: $Pr = \sum Pri = \sum mViTi = \sum mDi = mD$.

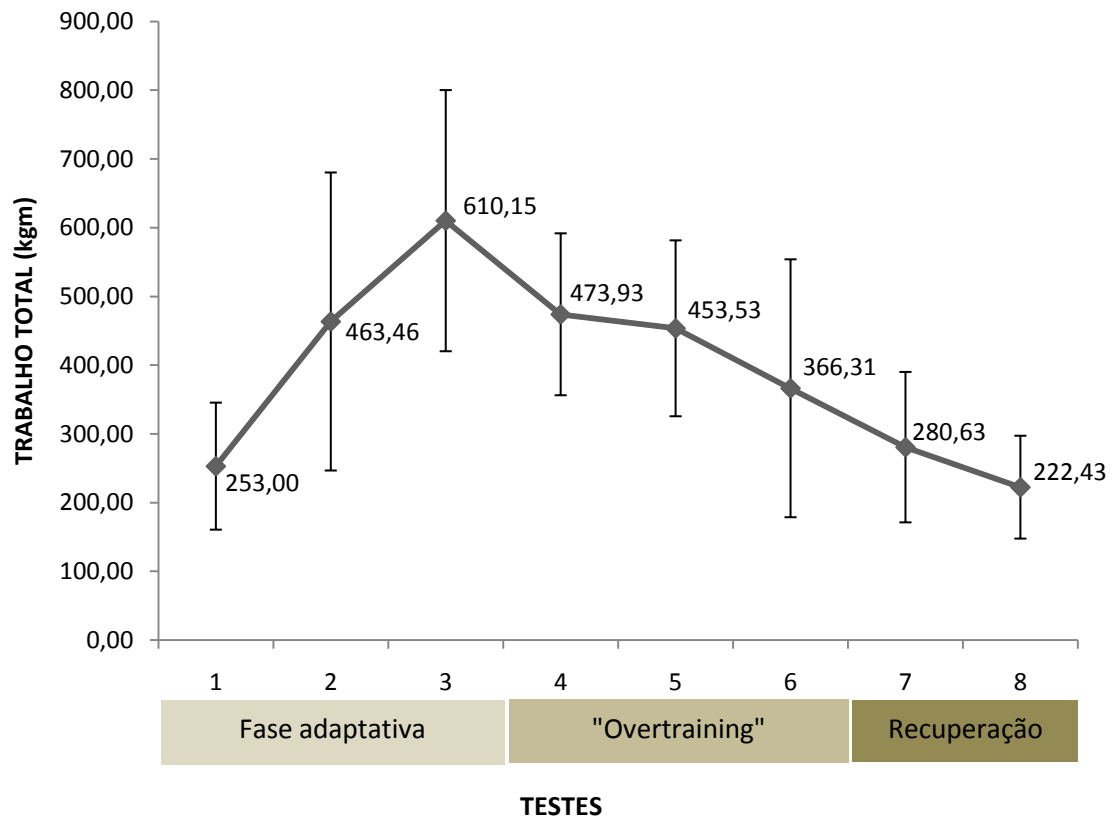


Figura 3: Gráfico dos valores de quantificação de desempenho nos animais que completaram os oito testes de desempenho, expresso em Kgm

Observa-se a melhora do desempenho dos animais durante a fase adaptativa do protocolo (testes de um a três). Após o início da nona semana (início da fase de *overtraining*), o desempenho dos animais diminuiu e, este desempenho manteve-se em declínio com o término das atividades físicas.

4.3. Peso das amostras de disco intervertebral dos animais

Após retirada da coluna em bloco, os últimos discos lombares (L5-L6 e L6-S1) foram cuidadosamente retirados e pesados (tabela 4 e figura 4).

Tabela 4: distribuição do peso dos discos (L5-L6 e L6-S1) entre os grupos, segundo a média, o desvio padrão (DP), o número de animais (N) e o valor *p*.

Variável	Grupo	Média	DP	N	p
Peso do disco (g)	OT-11sem	0,045	0,008	8	0,006
	OT-13sem	0,055	0,006	8	
	GC	0,059	0,011	10	
	GC-Ad	0,054	0,005	8	

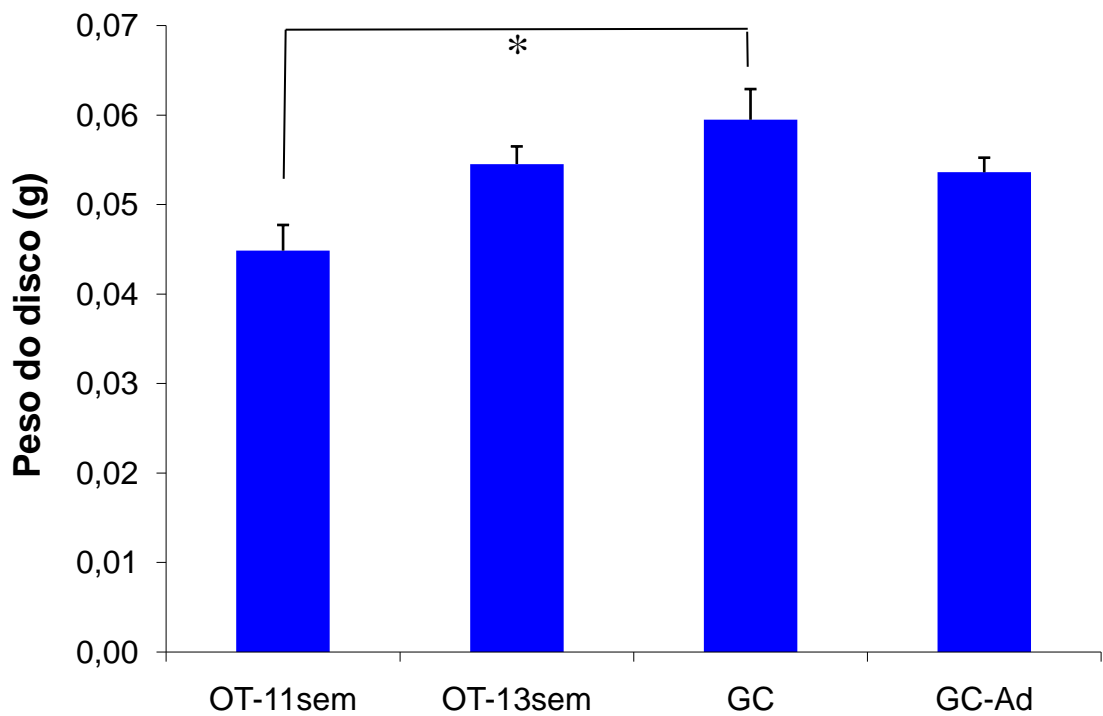


Figura 4: gráfico da distribuição do peso dos discos (em gramas) entre os grupos. * $p < 0,05$.

Houve uma diferença significativa somente entre os grupos GC e OT-11sem, não sendo observado diferenças entre os outros grupos.

4.4. Análise da concentração de GAGs no disco intervertebral

Os GAGs nas amostras foram calculadas por meio da densitometria da lâminas obtidas pelo seu comportamento eletroforético no gel de PDA (tabela 5 e figuras 5, 6, 7, 8 e 9)

Tabela 5: Distribuição da concentração de GAGs (em μg de GAG/g de tecido) entre os grupos, segundo a média, o desvio padrão (DP), o número de animais (N) e o valor p .

Variável	Grupo	Média	DP	N	P
GAG/tecido ($\mu\text{g/g}$)	OT-11sem	192,48	53,13	8	<0,001
	OT-13sem	85,70	44,29	8	
	GC	57,09	20,25	10	
	GC-Ad	163,99	126,59	8	

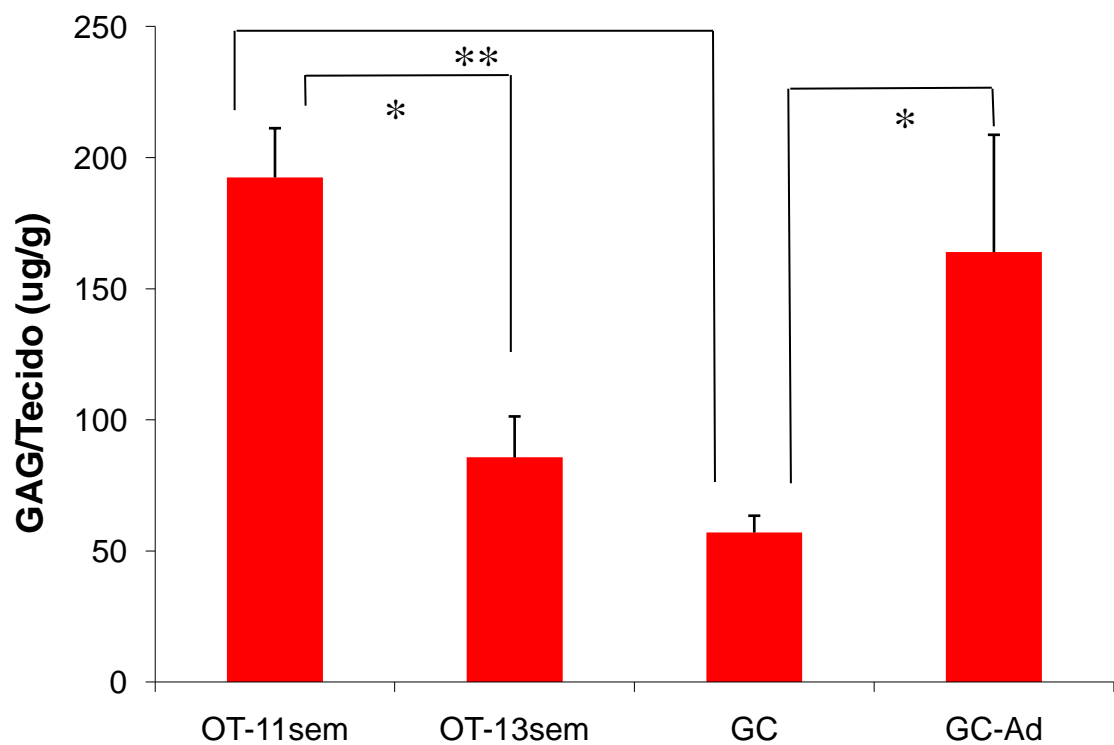


Figura 5: gráfico da distribuição da concentração de GAGs entre os grupos.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Os resultados mostram o aumento na concentração de GAGs nas amostras dos grupos OT-11sem e GC-Ad, sendo eles significativos em

relação ao grupo controle. Ainda, o grupo OT-11sem apresentou um aumento da concentração de GAGs, estatisticamente significativo, em relação ao grupo OT-13sem.

Em relação à corrida eletroforética dos GAGs, notou-se que as amostras concentravam-se entre os níveis de condroitim sulfato e dermatam sulfato, em todos os grupos (figuras 3, 4, 5 e 6).

4.4.1. Grupo Controle

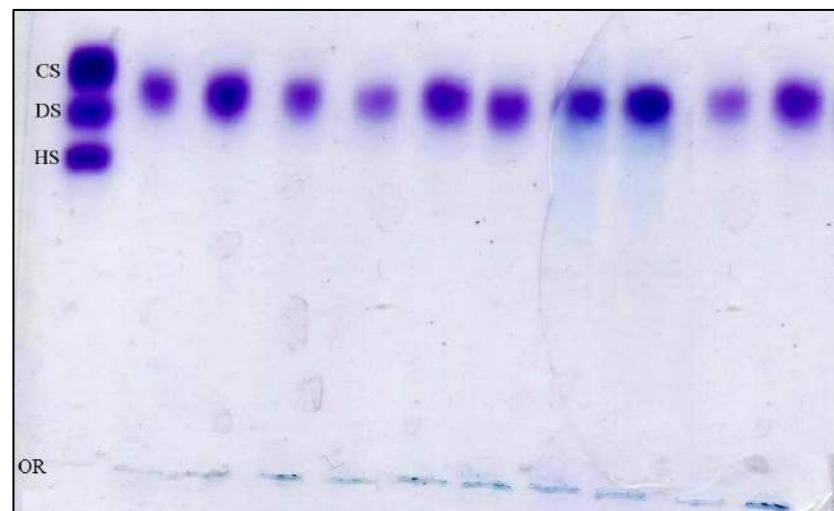


Figura 6: Comportamento eletroforético dos GAGs nas amostras do grupo controle. CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato; OR = origem.

4.4.2. Grupo Controle - Adaptado

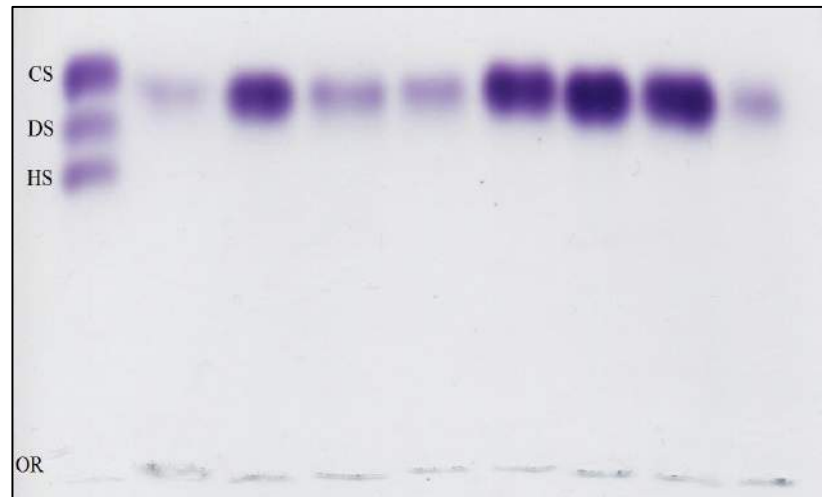


Figura 7: comportamento eletroforético dos GAGs nas amostras do grupo controle adaptado. CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato; OR = Origem

4.4.3. *Overtraining* - 11 semanas

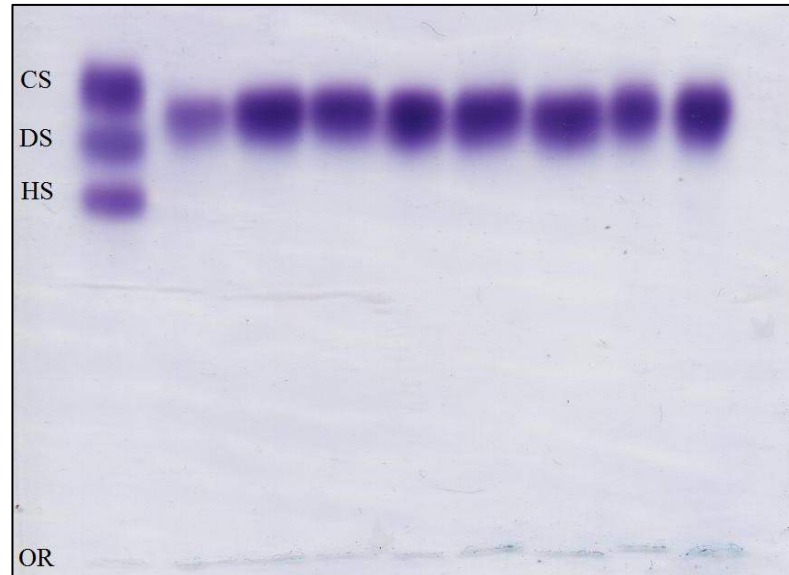


Figura 8: comportamento eletroforético dos GAGs nas amostras do grupo OT-11sem. CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato; OR = Origem

4.4.4. *Overtraining* -13 semanas

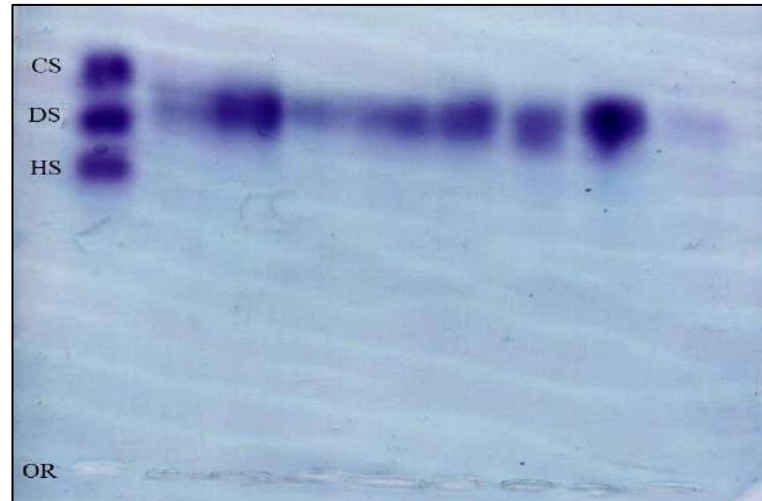


Figura 9: comportamento eletroforético dos GAGs nas amostras do grupo OT-13sem. CS = condroitim sulfato; DS = dermatam sulfato; HS = heparam sulfato; OR = origem.

4.5. Degradação enzimática das amostras

Neste estudo foi realizado a degradação enzimática dos glicosaminoglicanos através da enzima condroitinase AC e ABC, para caracterização do tipo de GAG contido nas amostras (figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18). Observou-se a predominância do dermatam sulfato nas amostras, não degradado pela condroitinase AC..

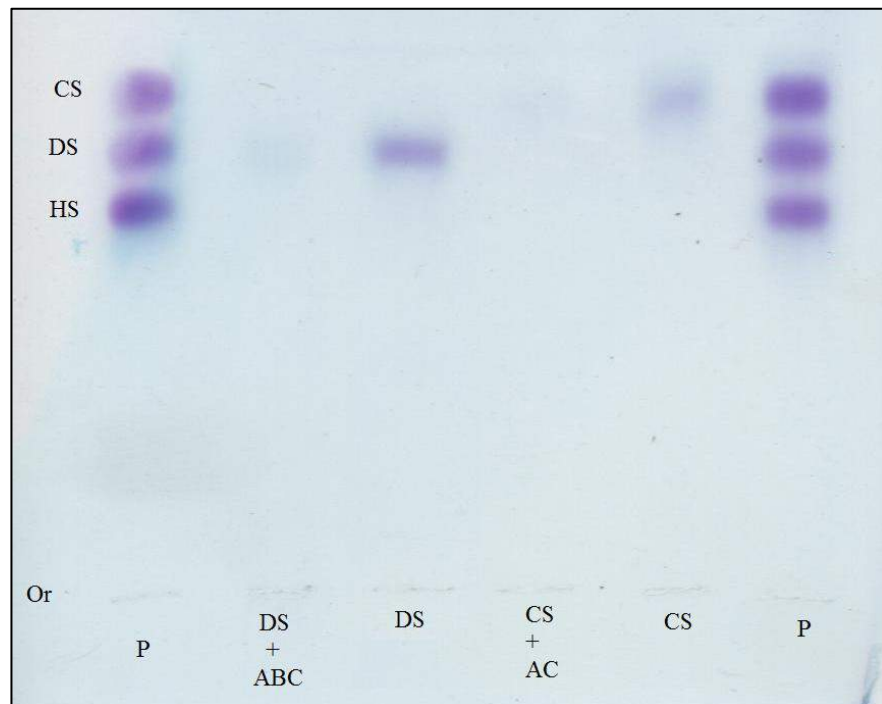


Figura 10: Imagem da lâmina de controle da atividade das enzimas utilizadas. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato, AC = condroitinase AC; ABC = condroitinase ABC; OR = origem

4.5.1. Grupo Controle

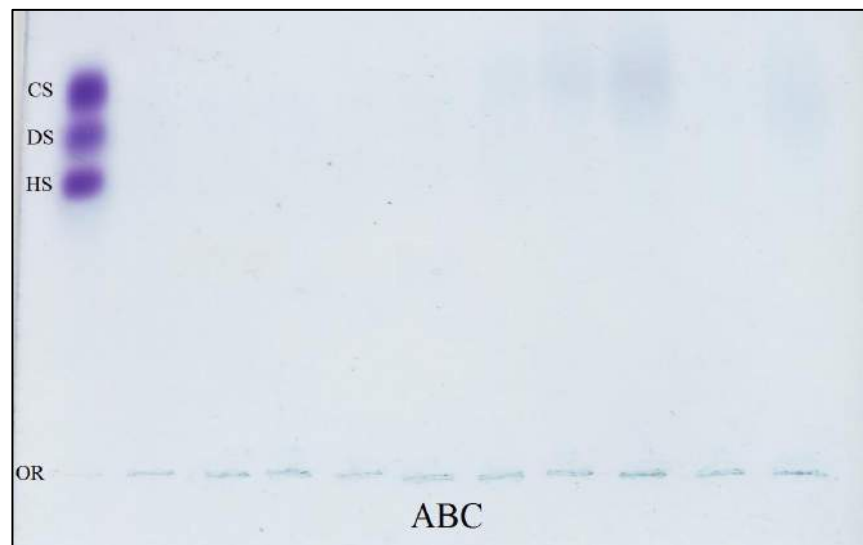


Figura 11: comportamento eletroforético das amostras do grupo GC submetidas a degradação pela enzima ABC. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato; OR = origem.

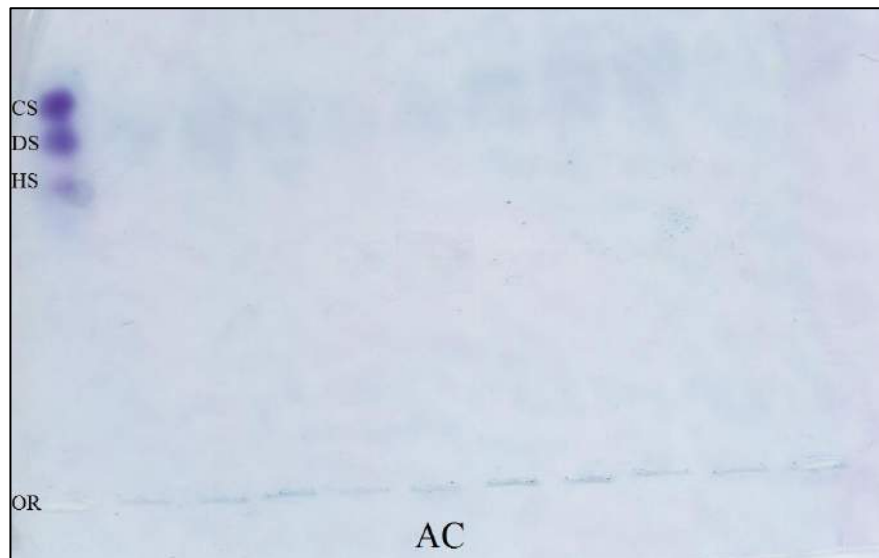


Figura 12: comportamento eletroforético das amostras do grupo GC submetidas a degradação pela enzima AC. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato; OR = origem.

4.5.2. Grupo Controle - Adaptado

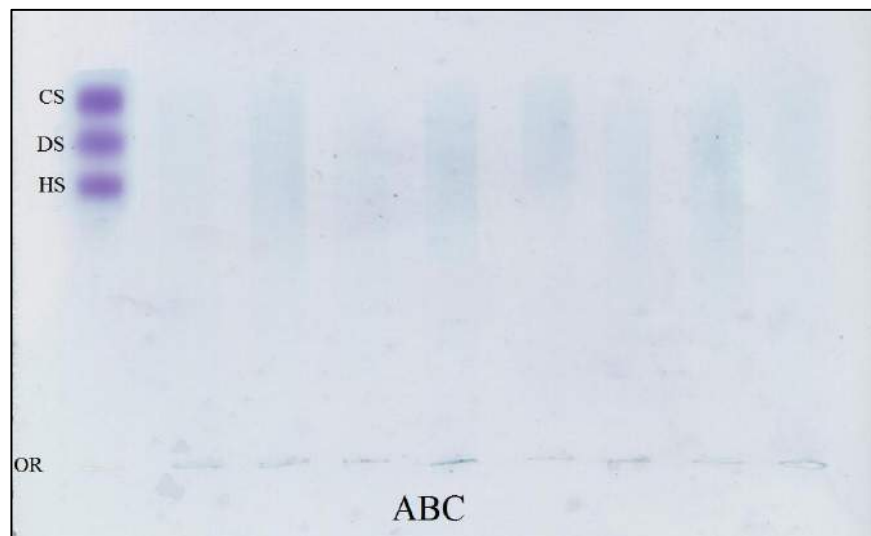


Figura 13: comportamento eletroforético das amostras do grupo GC-Ad submetidas a degradação pela enzima ABC. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato; OR = origem.

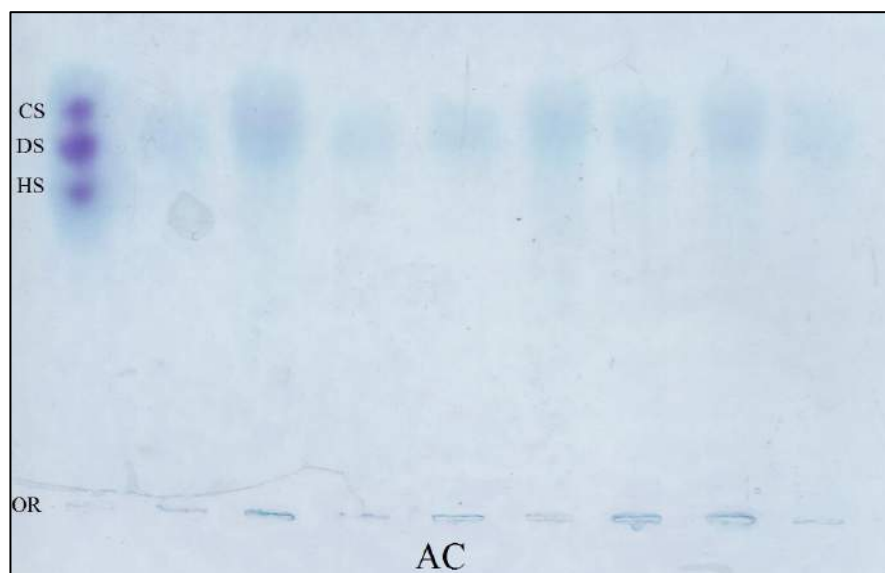


Figura 14: comportamento eletroforético das amostras do grupo GC-Ad submetidas a degradação pela enzima AC. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato; OR = origem.

4.5.3. *Overtraining* -11 semanas

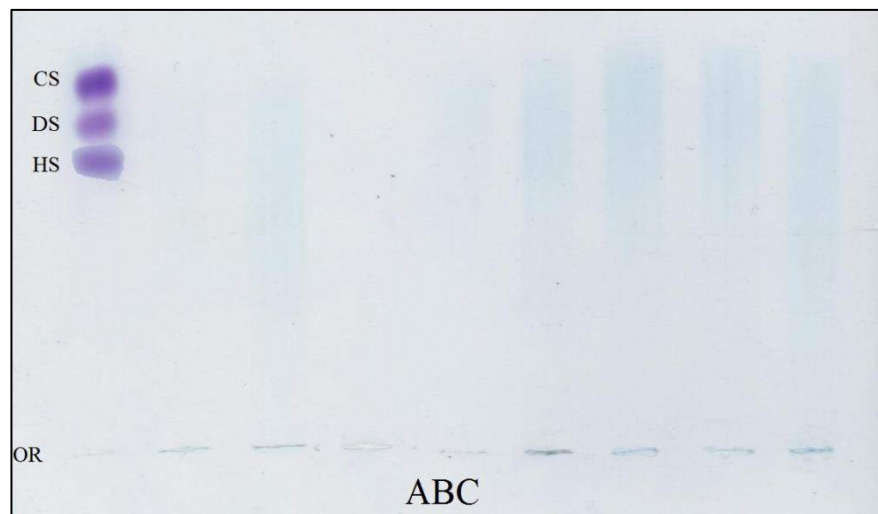


Figura 15: comportamento eletroforético das amostras do grupo OT-11sem submetidas a degradação pela enzima ABC. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato; OR = origem.

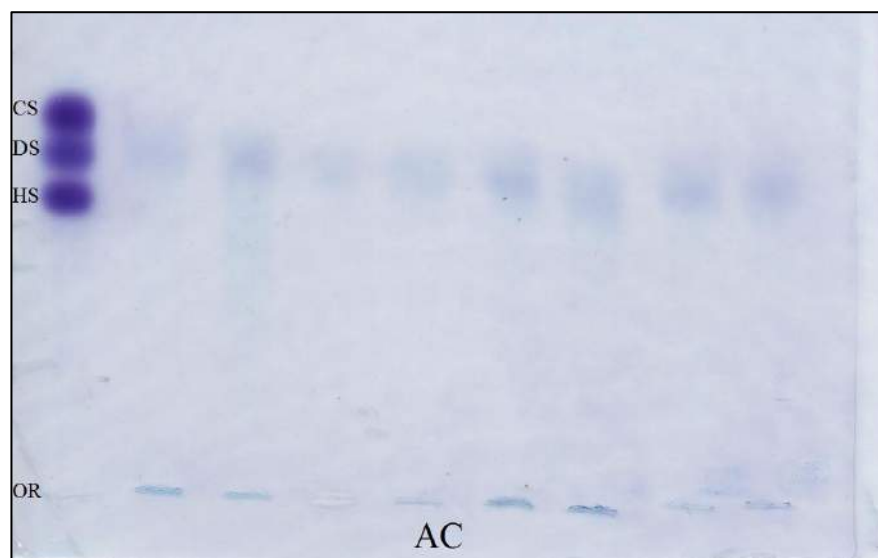


Figura 16: comportamento eletroforético das amostras do grupo OT-11sem submetidas a degradação pela enzima AC. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato; OR = origem.

4.5.4. *Overtraining* - 13 semanas



Figura 17: comportamento eletroforético das amostras do grupo OT-13sem submetidas a degradação pela enzima ABC. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato; OR = origem.

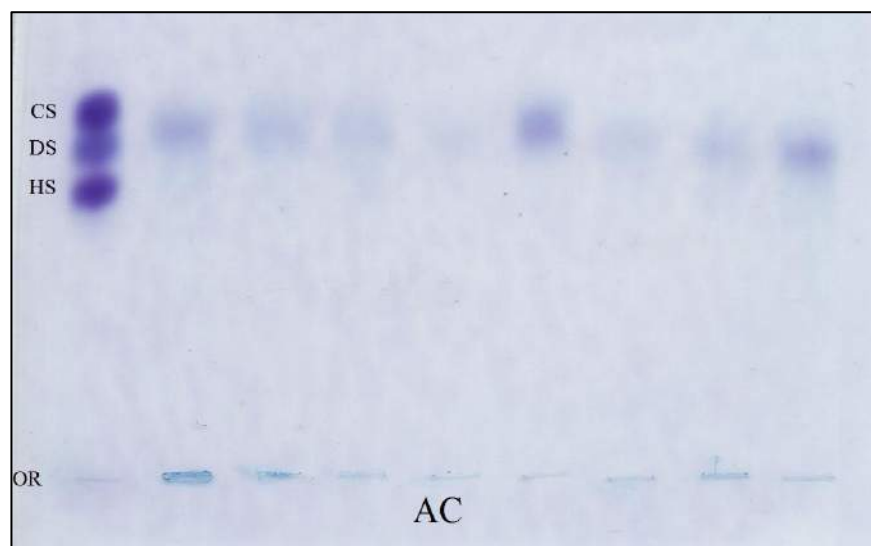


Figura 18: comportamento eletroforético das amostras do grupo OT-13sem submetidas a degradação pela enzima AC. CS = condroitim sulfato, DS = dermatam sulfato, HS = heparam sulfato; OR = origem.

5. DISCUSSÃO

O impacto da atividade física no ser humano é tema muito frequente na literatura. Estudos relatam desde efeitos positivos nos índices de qualidade de vida, até melhores resultados nas terapias de quimioterapia em indivíduos em tratamento de câncer (Rimmer, Chen *et al.*, 2010; Chen e Rimmer, 2011; Faul, Jim *et al.*, 2011). Também associam a prática esportiva às diversas doenças, como lesões ligamentares e articulares, lesões musculares e doenças na coluna vertebral (Helminen, Hyttinen *et al.*, 2000; Espanha, Lammi *et al.*, 2001)..

Quando estudamos a coluna vertebral, a atividade física tem gerado muita discussão (Bakker, Verhagen *et al.*, 2009). Diversos estudos em humanos, associam a prática de exercícios aos melhores resultados no tratamento de pacientes com dor lombar baixa (Imayama, Alfano *et al.*, 2011). Por outro lado, associam determinadas práticas esportivas às doenças na coluna vertebral, como a ginástica artística, o remo, o vôlei (Hangai, Kaneoka *et al.*, 2009; Hangai, Kaneoka *et al.*, 2010). Até mesmo a natação está descrita como causadora de dor lombar (Ferrell, 1999). Nesse esporte, no qual não há grande demanda de carga axial, o disco intervertebral também é afetado, mostrando que não somente o impacto é capaz de produzir alterações nessa estrutura. Vale ressaltar que esses estudos são na sua totalidade clínicos e radiográficos.

Diversos estudos descrevem o treinamento físico em animais (Lahaye, Gratas-Delamarche *et al.*, 2010). Esses autores utilizaram protocolo semelhante à fase adaptativa, primeiras oito semanas, do

utilizado no nosso estudo, para reproduzir o treinamento físico intenso nos animais e avaliar a expressão e responsividade dos β -adrenoceptores cardíacos de ratos diabéticos. Wang, Wisloff *et al.* (2010) descrevem diversos protocolos de treinamento de ratos, para avaliar a hipertrofia cardíaca. Os protocolos variaram de quatro a 30 semanas de treinamento, com sessões de 30 a 60 minutos e velocidade de 10 a 31 metros por minuto. Hohl, Ferrareso *et al.* (2009) elaboraram o protocolo de treinamento de animais (ratos), para induzir o estado de *overtraining*. Para validar o modelo, utilizaram medidas de marcadores bioquímicos (a razão glutamina/glutamato) e os testes de rendimento desses animais.

Na tese de doutorado de Franciozi (*comunicação pessoal*), da nossa Linha de Pesquisa, foi elaborado o protocolo de *ultraendurance* na qual os animais foram submetidos ao treinamento de corrida com duração inicial de 10 minutos na esteira, a velocidade de 10 metros por minuto, cinco dias por semana durante 12 semanas. Para o aprimoramento dos treinos e do condicionamento físico, a duração das sessões foi aumentada em 10 minutos a cada duas semanas e a velocidade de corrida corrigida em cinco metros por minuto a cada duas semanas até a sexta semana, quando os animais normalmente alcançavam a velocidade de 25 metros por minuto a 60% do VO_2 máximo em teste de velocidade máxima, permanecendo com velocidades em torno desse valor. Ao final das 12 semanas de treinamento, os animais GT, que correram em torno de 55 km, foram submetidos a um exercício de *ultraendurance* em esteira com intensidade que correspondeu a 60% do VO_2 máximo até a exaustão. Nessa tese foi estudado o efeito do treinamento físico na cartilagem articular dos joelhos desses animais.

Atualmente, a condição de *overtraining* é constantemente relatada no treinamento de atletas. Tal condição pode ser provocada pelo estresse de

competições, distúrbios nutricionais, distúrbios endócrinos e episódios de infecção (Foster, 1998; Petibois, Cazorla *et al.*, 2003; Robson, 2003). Muitas vezes o *overtraining* é ocasionado por erros de treinamentos, provocados pelo aumento da intensidade e frequência. Estudos associam a condição de *overtraining* a alterações bioquímicas como aumento da expressão da interleucina-6 (Robson, 2003), alterações no metabolismo dos lipídios e carboidratos, e alterações em neurotransmissores (Budgett, Hiscock *et al.*, 2010).

O objetivo do nosso estudo foi verificar o efeito da condição de *overtraining*, induzido por exercícios, nos discos intervertebrais, em modelo animal. No nosso estudo, utilizamos o protocolo de treinamento descrito por Hohl, Ferraresso *et al.* (2009), e para caracterizar a condição de *overtraining* desses animais, utilizamos como parâmetro os testes de rendimento. Nossos resultados nos permitiu aferir que o protocolo de *overtraining* foi reprodutível (figura 3), com rendimento dos animais aumentado até o terceiro teste, realizado na oitava semana do treinamento, final da fase adaptativa. Com o início da fase de *overtraining*, nona semana, o rendimento desses animais diminuiu, o que **configurou a condição de *overtraining***, mesmo após o término do treinamento, teste sete e oito; o rendimento desses animais manteve-se em declínio, caracterizando a condição de *overtraining*.

A determinação do processo degenerativo no disco intervertebral foi importante para entendermos as doenças na coluna vertebral e assim, estudar os fatores associados a ele. Ao avaliarmos a dosagem de glicosaminoglicanos na composição do disco nos animais desse estudo, podemos analisar o efeito da atividade física e da condição de *overtraining* nessa estrutura. A diminuição da concentração dos glicosaminoglicanos é

considerada como marcador precoce do processo degenerativo (Cs-Szabo, Ragasa-San Juan *et al.*, 2002; Beckstein, Sen *et al.*, 2008; Boxberger, Auerbach *et al.*, 2008; Boxberger, Orlansky *et al.*, 2009; Wuertz, Godburn *et al.*, 2009). Diversos estudos em modelo animal (ratos) comprovaram o efeito da diminuição dessas substâncias na biomecânica do disco intervertebral, como a diminuição da capacidade de absorver cargas axiais e de resistir às forças torcionais e de tensão (Iatridis, Mente *et al.*, 1999; Gruber, Johnson *et al.*, 2002; Boxberger, Orlansky *et al.*, 2009). A maior parte destes estudos utilizaram técnicas cirúrgicas, como a punção com agulhas no disco intervertebral ou químicas, como o uso da infusão de condroitinase ABC para digestão dos glicosaminoglicanos, para avaliar os efeitos biomecânicos da diminuição da concentração de GAGs no disco intervertebral.

Quando utilizamos o modelo animal para o estudo da coluna vertebral, nos deparamos com diversas questões. Ao comparar a composição do disco intervertebral de humano com o disco de ratos, modelo adotado nesse estudo, a população de células notocordais no disco humano se extingue na juventude, próximo aos dez anos de idade, enquanto nesses animais tais células ainda são encontradas ao redor dos 16 meses de vida (Hunter, Matyas *et al.*, 2004), idade essa próxima dos animais utilizados neste estudo. Estas células estão associadas ao maior poder regenerativo do disco dos animais (Lee, Sakai *et al.*, 2007).

Há ainda a dúvida em relação ao modelo animal, em relação à anatomia e biomecânica da coluna vertebral dos ratos. O fato desses animais terem postura quadrúpede e não bípede, e considerarmos a carga axial como fator promotor de degeneração do disco, o modelo animal apresenta um grande viés, pois, ao contrário de articulações como o joelho

a demanda sobre esta estrutura é menor. No entanto, na literatura encontramos estudos que validam este modelo (Gruber, Johnson *et al.*, 2002; Elliott e Sarver, 2004; Sarver e Elliott, 2005; Beckstein, Sen *et al.*, 2008). Nestes animais, a carga axial na coluna vertebral é gerada pela forte contração muscular durante a marcha, de forma muito semelhante à coluna humana (Macias, Cao *et al.*, 2007). Outros estudos ainda analisam as capacidades torcionais da coluna, demonstrando que o modelo animal, em ratos, é um modelo válido para estudo da coluna vertebral (Hsieh, Hwang *et al.*, 2009). Neste estudo foram utilizados os discos intervertebrais lombares, porque é nessa região da coluna vertebral dos ratos que o disco intervertebral mais se assemelha a dos humanos. Apesar deste modelo ser descrito e validado na literatura, em nosso estudo consideramos o treinamento físico como estímulo mecânico, e independente da carga axial, capaz de produzir alterações bioquímicas no disco. Analisamos também o impacto da condição de *overtraining* nesta estrutura, comparando-os com animais adaptados ao treinamento.

Puustjärvi, Lammi *et al.* (1994) realizaram estudo sobre os proteoglicanos no disco intervertebral de cachorros treinados num protocolo de um ano, percorrendo 40 km por dia, sendo observado alteração na síntese de proteoglicanos, avaliadas pela determinação dos GAGs, sugerindo o comprometimento das funções biomecânicas do disco intervertebral destes animais. Notaram também uma variação entre as diferentes regiões da coluna, sendo que na coluna lombar observou-se o aumento na concentração de GAGs.

Em estudo mais recente, Brisby, Wei *et al.* (2010) avaliaram o comportamento da matriz extracelular de animais (ratos) submetidos a carga de três semanas de treinamento físico, cinco dias por semana, uma

hora de treino por dia, com velocidade da esteira a 17 metros por minuto. Este protocolo foi comparado ao treinamento padrão de natação. Neste estudo observou-se efeito positivo da atividade física na produção de matriz extracelular, por meio de análises imunohistoquímicas, ausência de apoptose celular, com aumento na celularidade no disco intervertebral destes animais, sugerindo que a atividade física moderada pode ser um agente protetor da degeneração do disco.

No nosso estudo, avaliamos o efeito da condição de *overtraining* no disco intervertebral destes animais, por meio da análise bioquímica dos GAGs, buscando também determinar o tipo de GAG mais prevalente, por meio da degradação enzimática. Observamos que, assim como nos estudos já descritos (Brisby, Wei *et al.*, 2010), houve um aumento significativo da expressão de GAGs neste tecido. Todavia, não notamos diferença entre os animais que realizaram o treinamento até a fase adaptativa (GC-Ad) e os animais que realizaram o protocolo de *overtraining*, quando sacrificados 48 horas após o treino (OT-11sem). Sugerindo que a atividade mecânica dinâmica, gerada pelo treinamento na esteira, foi capaz de produzir uma resposta bioquímica no disco intervertebral, independente da condição de *overtraining*, concordando com o estudo de Wang, Jiang *et al.* (2007), mostrando uma resposta anabólica do disco intervertebral (*in vitro*), sob cargas dinâmicas.

No entanto, observamos também que houve diferença estatística da expressão de GAGs entre os grupos *overtraining* (OT-11sem e OT-13sem), sugerindo que a expressão dos GAGs produza resposta aguda e positiva ao estímulo mecânico, porque com um período de repouso de duas semanas, os valores do grupo OT-13sem foram muito semelhantes ao grupo controle (GC), que mostrou que ao cessar o estímulo mecânico nesta estrutura, a

expressão de GAGs é reversível, retornando a um valor próximo ao inicial. Esse comportamento dos glicosaminoglicanos também foi descrito por Kiviranta *et al.* (2005) quando estudaram a cartilagem dos joelhos de animais submetidos a imobilização por 11 semanas. Notaram diminuição de GAGs e da espessura da cartilagem, comparado aos animais que não foram imobilizados. Após retirar a imobilização dos animais, e estimular a movimentação por 15 semanas, a concentração de GAGs e da espessura da cartilagem retornaram aos valores basais, nos membros não imobilizados.

Em relação ao tipo de glicossaminoglicanos observado, notamos que houve predominância de dermatam sulfato nos discos intervertebrais dos animais que foram submetidos a qualquer tipo de treinamento (GC-Ad, OT-11sem e OT-13sem). Butler e Wels, (1971), mostraram a presença de dermatam sulfato no núcleo pulposo e, em menor quantidade, no ânulo fibroso de discos intervertebrais de gatos. Yoon e Halper, (2005) demonstraram em seu estudo a grande concentração de dermatam nos tendões. O dermatam sulfato é um GAG presente principalmente nos PG de baixo peso, como o biglicam e o decorim, e estão presentes no núcleo pulposo do disco intervertebral, principalmente dos discos imaturos, e sua expressão está aumentada quando o disco encontra-se em processo de reparação, que sugeriu que a predominância do dermatam sulfato no nosso estudo, pode estar associado à resposta adaptativa do disco ao estímulo mecânico gerado pelo treinamento na esteira.

Ao avaliarmos nossos resultados observamos que o protocolo proposto por Hohl, Ferraresso *et al.* (2009) foi reproduzível, pois por meio dos testes de desempenho, os animais apresentaram queda nos rendimentos, mesmo após terminar o protocolo de 11 semanas (figura 3). Notamos também que a atividade física nestes animais foi capaz de gerar resposta no

disco destes, com aumento da expressão de GAGs. No entanto, outros estudos poderão ser realizados, utilizando o mesmo protocolo de treinamento, para análise imunohistoquímica dos proteoglicanos presentes nesta estrutura sob a condição de *overtraining*, bem como na região das placas terminais, responsáveis por grande parte da nutrição dos discos intervertebrais. De maneira semelhante, para análise de marcadores inflamatórios presentes na condição de *overtraining*, como a interleucina 6 e de outras substâncias responsáveis pela regulação da expressão dos GAGs, como a interleucina-1 β .

6. CONCLUSÃO

Concluimos neste estudo, que o estímulo mecânico gerado pelo treinamento dos ratos na esteira, independente da carga axial nesta estrutura, foi capaz de gerar uma resposta bioquímica no disco intervertebral de ratos, causando o aumento da expressão de GAGs, com predominância do dermatam sulfato. Esta resposta é reversível com o término do estímulo.

Concluimos também, que o estado de *overtraining* não gerou resposta negativa no disco destes animais. Seus efeitos foram decorrentes do treinamento na esteira, com respostas semelhantes aos animais treinados que não apresentaram a condição de *overtraining*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bakker, E. W. *Et Al.* Spinal Mechanical Load As A Risk Factor For Low Back Pain: A Systematic Review Of Prospective Cohort Studies. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 34, N. 8, P. E281-93, Apr 2009.

Beckstein, J. C. *Et Al.* Comparison Of Animal Discs Used In Disc Research To Human Lumbar Disc: Axial Compression Mechanics And Glycosaminoglycan Content. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 33, N. 6, P. E166-73, Mar 2008.

Bouças, R. I. *Et Al.* Development Of An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa)-Like Fluorescence Assay To Investigate The Interactions Of Glycosaminoglycans To Cells. *Anal Chim Acta* [S.I.], V. 618, N. 2, P. 218-26, Jun 2008.

Boxberger, J. I. *Et Al.* An In Vivo Model Of Reduced Nucleus Pulposus Glycosaminoglycan Content In The Rat Lumbar Intervertebral Disc. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 33, N. 2, P. 146-54, Jan 2008.

_____. Reduced Nucleus Pulposus Glycosaminoglycan Content Alters Intervertebral Disc Dynamic Viscoelastic Mechanics. *J Biomech* [S.I.], V. 42, N. 12, P. 1941-6, Aug 2009.

_____. Nucleus Pulposus Glycosaminoglycan Content Is Correlated With Axial Mechanics In Rat Lumbar Motion Segments. *J Orthop Res* [S.I.], V. 24, N. 9, P. 1906-15, Sep 2006.

Brenner, J. S.; Fitness, A. A. O. P. C. O. S. M. A. Overuse Injuries, Overtraining, And Burnout In Child And Adolescent Athletes. *Pediatrics* [S.I.], V. 119, N. 6, P. 1242-5, Jun 2007.

Brisby, H. *Et Al.* The Effect Of Running Exercise On Intervertebral Disc Extracellular Matrix Production In A Rat Model. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 35, N. 15, P. 1429-36, Jul 2010.

Budgett, R. *Et Al.* The Effects Of The 5-Ht_{2c} Agonist M-Chlorophenylpiperazine On Elite Athletes With Unexplained Underperformance Syndrome (Overtraining). *Br J Sports Med* [S.I.], V. 44, N. 4, P. 280-3, Mar 2010.

Butler, W. F.; Wels, C. M. Glycosaminoglycans Of Cat Intervertebral Disc. *Biochem J* [S.I.], V. 122, N. 5, P. 647-52, May 1971.

Chen, M. D.; Rimmer, J. H. Effects Of Exercise On Quality Of Life In Stroke Survivors: A Meta-Analysis. *Stroke* [S.I.], V. 42, N. 3, P. 832-7, Mar 2011.

Cs-Szabo, G. *Et Al.* Changes In Mrna And Protein Levels Of Proteoglycans Of The Anulus Fibrosus And Nucleus Pulposus During Intervertebral Disc Degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 27, N. 20, P. 2212-9, Oct 2002.

Dishman, R. K. *Et Al.* Open-Field Behavior Is Not Related To Treadmill Performance In Exercising Rats. *Physiol Behav* [S.I.], V. 43, N. 5, P. 541-6, 1988.

Elliott, D. M.; Sarver, J. J. Young Investigator Award Winner: Validation Of The Mouse And Rat Disc As Mechanical Models Of The Human Lumbar Disc. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 29, N. 7, P. 713-22, Apr 2004.

Elliott, D. M. *Et Al.* The Effect Of Relative Needle Diameter In Puncture And Sham Injection Animal Models Of Degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 33, N. 6, P. 588-96, Mar 2008.

Espanha, M. M. *Et Al.* Extracellular Matrix Composition Of Full-Thickness Defect Repair Tissue Is Little Influenced By Exercise In Rat Articular Cartilage. *Connect Tissue Res* [S.I.], V. 42, N. 2, P. 97-109, Oct 2001.

Faul, L. A. *Et Al.* Relationship Of Exercise To Quality Of Life In Cancer Patients Beginning Chemotherapy. *J Pain Symptom Manage* [S.I.], Feb 2011.

Ferrell, M. C. The Spine In Swimming. *Clin Sports Med* [S.I.], V. 18, N. 2, P. 389-93, Viii, Apr 1999.

Foster, C. Monitoring Training In Athletes With Reference To Overtraining Syndrome. *Med Sci Sports Exerc* [S.I.], V. 30, N. 7, P. 1164-8, Jul 1998.

Gruber, H. E. *Et Al.* The Sand Rat Model For Disc Degeneration: Radiologic Characterization Of Age-Related Changes: Cross-Sectional And Prospective Analyses. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 27, N. 3, P. 230-4, Feb 2002.

Han, B. *Et Al.* A Simple Disc Degeneration Model Induced By Percutaneous Needle Puncture In The Rat Tail. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 33, N. 18, P. 1925-34, Aug 2008.

Hangai, M. *Et Al.* Lumbar Intervertebral Disk Degeneration In Athletes. *Am J Sports Med* [S.I.], V. 37, N. 1, P. 149-55, Jan 2009.

_____. Relationship Between Low Back Pain And Competitive Sports Activities During Youth. *Am J Sports Med* [S.I.], V. 38, N. 4, P. 791-6, Apr 2010.

Hardingham, T. E.; Adams, P. A Method For The Determination Of Hyaluronate In The Presence Of Other Glycosaminoglycans And Its

Application To Human Intervertebral Disc. *Biochem J* [S.I.], V. 159, N. 1, P. 143-7, Oct 1976.

Helminen, H. J. *Et Al.* Regular Joint Loading In Youth Assists In The Establishment And Strengthening Of The Collagen Network Of Articular Cartilage And Contributes To The Prevention Of Osteoarthritis Later In Life: A Hypothesis. *J Bone Miner Metab* [S.I.], V. 18, N. 5, P. 245-57, 2000.

Hiyama, A. *Et Al.* Activation Of Tonebp By Calcium Controls {Beta}1,3-Glucuronosyltransferase-I Expression, A Key Regulator Of Glycosaminoglycan Synthesis In Cells Of The Intervertebral Disc. *J Biol Chem* [S.I.], V. 284, N. 15, P. 9824-34, Apr 2009.

Hohl, R. *Et Al.* Development And Characterization Of An Overtraining Animal Model. *Med Sci Sports Exerc* [S.I.], V. 41, N. 5, P. 1155-63, May 2009.

Holm, S.; Nachemson, A. Variations In The Nutrition Of The Canine Intervertebral Disc Induced By Motion. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 8, N. 8, P. 866-74, 1983 Nov-Dec 1983.

Hsieh, A. H. *Et Al.* Degenerative Anular Changes Induced By Puncture Are Associated With Insufficiency Of Disc Biomechanical Function. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 34, N. 10, P. 998-1005, May 2009.

Hunter, C. J. *Et Al.* Cytomorphology Of Notochordal And Chondrocytic Cells From The Nucleus Pulposus: A Species Comparison. *J Anat* [S.I.], V. 205, N. 5, P. 357-62, Nov 2004.

Iatridis, J. C. *Et Al.* Compression-Induced Changes In Intervertebral Disc Properties In A Rat Tail Model. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 24, N. 10, P. 996-1002, May 1999.

_____. Alterations In The Mechanical Behavior Of The Human Lumbar Nucleus Pulposus With Degeneration And Aging. *J Orthop Res* [S.I.], V. 15, N. 2, P. 318-22, Mar 1997.

Imayama, I. *Et Al.* Effects Of 12-Month Exercise On Health-Related Quality Of Life: A Randomized Controlled Trial. *Prev Med* [S.I.], Feb 2011.

Johnstone, B. *Et Al.* Identification And Characterization Of Glycanated And Non-Glycanated Forms Of Biglycan And Decorin In The Human Intervertebral Disc. *Biochem J* [S.I.], V. 292 (Pt 3), P. 661-6, Jun 1993.

Jones, M. A. *Et Al.* Recurrent Non-Specific Low-Back Pain In Adolescents: The Role Of Exercise. *Ergonomics* [S.I.], V. 50, N. 10, P. 1680-8, Oct 2007.

Kibler, W. B. *Et Al.* Musculoskeletal Adaptations And Injuries Due To Overtraining. *Exerc Sport Sci Rev* [S.I.], V. 20, P. 99-126, 1992.

Kiviranta, I, *Et Al.* Articular Cartilage Thickness And Glycosaminoglycan Distribution In The Young Canine Knee Joint After Remobilization Of The Immobilized Limb. *J Orthop Res* [S.I.], V. 12, N. 2, P. 161-167, 1994

Korecki, C. L. *Et Al.* Intervertebral Disc Cell Response To Dynamic Compression Is Age And Frequency Dependent. *J Orthop Res* [S.I.], V. 27, N. 6, P. 800-6, Jun 2009.

Lahaye, S. E. D. *Et Al.* Intense Exercise Training Induces Adaptation In Expression And Responsiveness Of Cardiac B-Adrenoceptors In Diabetic Rats. *Cardiovasc Diabetol* [S.I.], V. 9, P. 72, 2010.

Lee, C. R. *Et Al.* A Phenotypic Comparison Of Intervertebral Disc And Articular Cartilage Cells In The Rat. *Eur Spine J* [S.I.], V. 16, N. 12, P. 2174-85, Dec 2007.

Liang, Q. Q. *Et Al.* Prolonged Upright Posture Induces Degenerative Changes In Intervertebral Discs In Rat Lumbar Spine. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 33, N. 19, P. 2052-8, Sep 2008.

Luo, X. *Et Al.* Estimates And Patterns Of Direct Health Care Expenditures Among Individuals With Back Pain In The United States. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 29, N. 1, P. 79-86, Jan 2004.

Macias, B. R. *Et Al.* Lbnp Treadmill Exercise Maintains Spine Function And Muscle Strength In Identical Twins During 28-Day Simulated Microgravity. *J Appl Physiol* [S.I.], V. 102, N. 6, P. 2274-8, Jun 2007.

Meeusen, R. *Et Al.* Diagnosing Overtraining In Athletes Using The Two-Bout Exercise Protocol. *Br J Sports Med* [S.I.], V. 44, N. 9, P. 642-8, Jul 2010.

Melrose, J. *Et Al.* A Comparative Analysis Of The Differential Spatial And Temporal Distributions Of The Large (Aggrecan, Versican) And Small (Decorin, Biglycan, Fibromodulin) Proteoglycans Of The Intervertebral Disc. *J Anat* [S.I.], V. 198, N. Pt 1, P. 3-15, Jan 2001.

_____. Elevated Synthesis Of Biglycan And Decorin In An Ovine Annular Lesion Model Of Experimental Disc Degeneration. *Eur Spine J* [S.I.], V. 6, N. 6, P. 376-84, 1997.

O'connell, G. D. *Et Al.* Comparison Of Animals Used In Disc Research To Human Lumbar Disc Geometry. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 32, N. 3, P. 328-33, Feb 2007.

Olczyk, K. Age-Related Changes In Glycosaminoglycans Of Human Intervertebral Discs. *Folia Histochem Cytobiol* [S.I.], V. 31, N. 4, P. 215-20, 1993.

Petibois, C. *Et Al.* Biochemical Aspects Of Overtraining In Endurance Sports : The Metabolism Alteration Process Syndrome. *Sports Med* [S.I.], V. 33, N. 2, P. 83-94, 2003.

Puustjärvi, K. *Et Al.* Proteoglycans In The Intervertebral Disc Of Young Dogs Following Strenuous Running Exercise. *Connect Tissue Res* [S.I.], V. 30, N. 3, P. 225-40, 1994.

Rimmer, J. H. *Et Al.* Exercise Intervention Research On Persons With Disabilities: What We Know And Where We Need To Go. *Am J Phys Med Rehabil* [S.I.], V. 89, N. 3, P. 249-63, Mar 2010.

Robson, P. Elucidating The Unexplained Underperformance Syndrome In Endurance Athletes : The Interleukin-6 Hypothesis. *Sports Med* [S.I.], V. 33, N. 10, P. 771-81, 2003.

Roughley, P. J. Biology Of Intervertebral Disc Aging And Degeneration: Involvement Of The Extracellular Matrix. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 29, N. 23, P. 2691-9, Dec 2004.

Sarver, J. J.; Elliott, D. M. Mechanical Differences Between Lumbar And Tail Discs In The Mouse. *J Orthop Res* [S.I.], V. 23, N. 1, P. 150-5, Jan 2005.

Scott, J. E. *Et Al.* The Chemical Morphology Of Age-Related Changes In Human Intervertebral Disc Glycosaminoglycans From Cervical, Thoracic And Lumbar Nucleus Pulposus And Annulus Fibrosus. *J Anat* [S.I.], V. 184 (Pt 1), P. 73-82, Feb 1994.

Singh, K. *Et Al.* Age-Related Changes In The Extracellular Matrix Of Nucleus Pulposus And Anulus Fibrosus Of Human Intervertebral Disc. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 34, N. 1, P. 10-6, Jan 2009.

Soler, T.; Calderón, C. The Prevalence Of Spondylolysis In The Spanish Elite Athlete. *Am J Sports Med* [S.I.], V. 28, N. 1, P. 57-62, 2000 Jan-Feb 2000.

Stokes, I. A.; Iatridis, J. C. Mechanical Conditions That Accelerate Intervertebral Disc Degeneration: Overload Versus Immobilization. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 29, N. 23, P. 2724-32, Dec 2004.

Strowbridge, N. F. Gender Differences In The Cause Of Low Back Pain In British Soldiers. *J R Army Med Corps* [S.I.], V. 151, N. 2, P. 69-72, Jun 2005.

Sztrolovics, R. *Et Al.* Age-Related Changes In Fibromodulin And Lumican In Human Intervertebral Discs. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 24, N. 17, P. 1765-71, Sep 1999.

Säämänen, A. M. *Et Al.* Effect Of Running Exercise On Proteoglycans And Collagen Content In The Intervertebral Disc Of Young Dogs. *Int J Sports Med* [S.I.], V. 14, N. 1, P. 48-51, Jan 1993.

_____. Proteoglycan Alterations Following Immobilization And Remobilization In The Articular Cartilage Of Young Canine Knee (Stifle) Joint. *J Orthop Res* [S.I.], V. 8, N. 6, P. 863-73, Nov 1990.

Villavicencio, A. T. *Et Al.* Back And Neck Pain In Triathletes. *Neurosurg Focus* [S.I.], V. 21, N. 4, P. E7, 2006.

Wang, D. L. *Et Al.* Biologic Response Of The Intervertebral Disc To Static And Dynamic Compression In Vitro. *Spine (Phila Pa 1976)* [S.I.], V. 32, N. 23, P. 2521-8, Nov 2007.

Wang, Y. *Et Al.* Animal Models In The Study Of Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy. *Physiol Res* [S.I.], V. 59, N. 5, P. 633-44, 2010.

White, T. L.; Malone, T. R. Effects Of Running On Intervertebral Disc Height. *J Orthop Sports Phys Ther* [S.I.], V. 12, N. 4, P. 139-46, 1990.

Wuertz, K. *Et Al.* In Vivo Remodeling Of Intervertebral Discs In Response To Short- And Long-Term Dynamic Compression. *J Orthop Res* [S.I.], V. 27, N. 9, P. 1235-42, Sep 2009.

Referências Bibliográficas

Yerramalli, C. S. *Et Al.* The Effect Of Nucleus Pulposus Crosslinking And Glycosaminoglycan Degradation On Disc Mechanical Function. *Biomech Model Mechanobiol* [S.I.], V. 6, N. 1-2, P. 13-20, Jan 2007.

Yoon, J. H.; Halper, J. Tendon Proteoglycans: Biochemistry And Function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* [S.I.], V. 5, N. 1, P. 22-34, Mar 2005.

8. Normas Adotadas

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org/>

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) – Princípios éticos da experimentação animal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.cobea.org.br/>

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001. 248p.

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>

FERREIRA, LM. Orientação Normativa Para Elaboração E Apresentação De Teses - GUIA PRÁTICO, São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora LTDA; 2008. 84p.

9. Abstract

Introduction: decreased concentration of glycosaminoglycans (GAGs) shows an early marker of the degenerative intervertebral disc decrease. The effect of physical activity is still controversial, may cause damage or protect the disc.

Objective: study the effect of overtraining, induced by physical training in the intervertebral discs of trained rats, by mean of the biochemical behavior of GAGs.

Methods: 34 Wistar rats were used, ten animals did not undergo physical training (GC), eight were trained on the treadmill, but did not realize the overtraining stage of the training protocol (GC-Ad), eight have completed the protocol of overtraining and were sacrificed within 48 hours (OT 11 weeks) and after two weeks (OT 13 weeks). Discs were removed from the L5-L6 and L6-S1 and performed a biochemical analysis of GAGs.

Results: The animals that underwent all the training protocol reached a overtraining status, because no improvement in their performance, even after cessation of training, were observed. In the analysis of GAGs, we noticed an increased concentration of GAGs in the groups OT-11 weeks and GC-Ad. An important difference between the group OT-11 weeks with the groups OT 13 weeks and GC were observed. Similarly, there was a difference between the GC and GC-Ad. In samples taken from animals undergoing training, included the GC-Ad group, there was a predominance of dermatan sulfate.

Conclusion: the physical training of the animals were able to generate a biochemical response in the intervertebral discs. Been shown an increased concentration of GAGs, with predominant expression of dermatan sulfate. The overtraining status did not generate a different response, compared with the trained group, which was not subjected to the full overtraining protocol. Being observed that the response was reversible after two weeks of rest.

10. Anexos

Anexo 1: parecer do comitê de ética



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 12 de março de 2010.
CEP 0251/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) RENATO HIROSHI SALVIONI UETA
Co-Investigadores: Carlos Eduardo da Silveira Franciozi, Vitor Alexandre Ferreira Tarini, Flávio Faloppa (orientador)
Disciplina/Departamento: Ortopedia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “Efeito do exercício de ultraendurance no disco intervertebral de ratos treinados”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Estudar o efeito da atividade física (em exercícios de ultraendurance) no disco intervertebral dos ratos, através do comportamento dos componentes da matriz extracelular e dos glicosaminoglicanos no seu interior..

RESUMO: Estudo com 42 ratos Wistar, machos, adultos. Método de eutanásia: decapitação. Serão constituídos 2 grupos: grupo treinamento (GT) e grupo controle (GC). Os animais pertencentes ao grupo GT serão submetidos a um treinamento de corrida com duração inicial de 40 minutos na esteira a uma velocidade de 20 m por minutos, cinco dias por semana durante 12 semanas. A cada semana serão acrescentados cinco minutos no tempo total, para o aprimoramento do condicionamento físico. Ao final das 12 semanas de treinamento, os animais do grupo GT serão submetidos a um exercício de ultraendurance em esteira a uma intensidade que corresponderá a 60% de VO2 máximo até a exaustão. Ao final do exercício todos os animais de ambos os grupos deverão ser sacrificados. Será retirado material para análise do disco intervertebral para avaliação histomorfométrica e organização geral. Serão realizadas colorações de HE e Picrosírius. Será avaliado o processo de morte celular através da análise de apoptose e necrose, com o kit apoptag e caspase-3 para avaliar apoptose. Para necrose serão utilizados marcadores de interleucina 1 e TNF-alfa. Serão realizadas colorações de alcian blue combinado com PAS para avaliar a organização e quantificação dos glicosaminoglicanos da cartilagem articular. Será realizada extração dos glicosaminoglicanos sulfatados do disco intervertebral e análise..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Este estudo testará a hipótese de que a atividade física de longa duração em animais treinados, mesmo na ausência de carga axial, é capaz de gerar o processo degenerativo no disco intervertebral..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo..

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$28927,79.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 7/3/2011 e 6/3/2012.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Anexo 2: Tabela com os valores da quantificação dos testes de rendimento dos animais estudados.

Ratos	teste 1	teste 2	teste 3	teste 4	teste 5	teste 6	teste 7	teste 8
1	229,32	464,11	473,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	216,93	583,11	825,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	222,73	486,94	544,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	208,36	502,84	806,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	213,62	449,71	528,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	206,17	518,34	534,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	197,89	475,52	541,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	224,64	464,10	528,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	235,87	344,40	427,05	469,15	461,32	457,48	0,00	0,00
10	315,90	543,40	760,03	463,32	283,86	493,77	0,00	0,00
11	182,07	318,78	261,45	531,36	397,80	262,08	0,00	0,00
12	277,20	697,53	353,84	770,11	206,28	610,74	0,00	0,00
13	273,00	577,98	346,32	267,16	231,21	579,42	0,00	0,00
14	174,24	489,88	430,50	296,20	296,93	584,05	0,00	0,00
15	247,57	352,17	577,98	504,25	267,44	414,72	0,00	0,00
16	234,00	632,66	750,69	707,83	377,56	476,70	0,00	0,00
17	346,52	641,70	641,25	691,92	534,07	695,64	322,92	223,02
18	196,23	440,64	827,64	449,28	477,36	427,35	230,04	173,50
19	151,20	116,04	323,85	274,11	219,87	131,54	112,30	173,73
20	372,70	689,47	764,06	549,22	437,58	357,55	412,65	299,11
21	366,76	739,87	846,72	421,35	637,36	418,95	448,35	371,77
22	177,14	400,14	492,48	475,11	460,98	210,60	257,04	162,16
23	215,28	256,27	466,83	449,23	524,88	504,14	225,18	199,27
24	198,19	423,54	518,40	481,23	336,16	184,68	236,52	176,90

11. Fontes Consultadas

WEISZFLOG, W. Michaelis Dicionário Escolar Língua Portuguesa, 7. ed.
São Paulo: Melhoramentos, 2010. 951p

KIRKWOOD, B. R. and STERNE, J. A. C (2006). Essential medical
statistics. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. 502 p.