
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE
(BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA)

**EFEITOS DE QUATRO MODELOS DE TREINAMENTO
EXPERIMENTAL DE NATAÇÃO SOBRE BIOMARCADORES
DE ADAPTAÇÃO E CAPACIDADES AERÓBIA E
ANAERÓBIA EM RATOS WISTAR**

GUSTAVO GOMES DE ARAUJO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do *Campus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade

**Rio Claro
2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
RIO CLARO



GUSTAVO GOMES DE ARAUJO

**EFEITOS DE QUATRO MODELOS DE TREINAMENTO
EXPERIMENTAL DE NATAÇÃO SOBRE BIOMARCADORES
DE ADAPTAÇÃO E CAPACIDADES AERÓBIA E
ANAERÓBIA EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do *Câmpus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO

**Rio Claro
2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
RIO CLARO



GUSTAVO GOMES DE ARAUJO

**EFEITOS DE QUATRO MODELOS DE TREINAMENTO
EXPERIMENTAL DE NATAÇÃO SOBRE BIOMARCADORES
DE ADAPTAÇÃO E CAPACIDADES AERÓBIA E
ANAERÓBIA EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do *Campus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade

Comissão Examinadora

Dr. Claudio Alexandre Gobatto
Dra. Maria Alice Rostom de Mello
Dra. Denise Vaz de Macedo
Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva
Dr. Sergio Eduardo Andrade Perez

Rio Claro, 26 de Abril de 2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
RIO CLARO



APOIO FINANCEIRO



PROCESSO

#2006/58411-2

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelas infinitas bênçãos concedidas pelo alento e consolo nos momentos de dificuldade e pela misericórdia. Se não fosse Deus nada disso seria possível.

As inúmeras pessoas que passaram na minha vida por esses anos de doutorado. Cronologicamente, gostaria de agradecer ao meu cunhado Evandro que graças a sua vivência acadêmica me aconselhou a frequentar um laboratório desde meu primeiro ano de graduação. A professora Bel (Orientadora do meu cunhado) que mesmo eu não a conhecendo pessoalmente me indicou para o professor Claudio Alexandre Gobatto que com sua atenção, educação e disposição intrínseca a ele me recepcionou e possibilitou começar minha iniciação científica na UNESP.

Ainda em relação ao professor Claudio não poderia deixar de agradecê-lo especialmente pela dedicação e paciência em me ensinar os caminhos necessários para terminar essa jornada e iniciar a carreira acadêmica. Tudo que escrever nesse espaço da tese não representará toda minha gratidão, admiração e respeito em relação ao Claudio que me ensinou muito além do conhecimento científico. Serei eternamente grato por ter confiado em mim e por ter feito um papel de educador/orientador além.

Ao Marcelo Papoti que me ensinou incansavelmente todos os passos necessários para prosseguir na carreira acadêmica. Agradeço ao Papoti também pela paciência, dedicação e disposição em me co-orientar com grande competência. Minha gratidão em relação ao Papoti sempre será eterna e sempre levarei comigo a sua alegria em pesquisar. Muito obrigado.

A Fúlvia a qual admiro imensamente por sua competência profissional, paciência e entusiasmo em servir a todos que estão ao seu redor. Agradeço por ser uma amiga e por ter confiado em mim na indicação para meu primeiro emprego. Serei eternamente grato a você pelos trabalhos em conjunto e por ter aberto as portas para minha carreira.

Ao meu eterno amigo Ricardo Vinicius Ledesma Contarteze (em memória) que em 4 anos de convivência pude conhecer um verdadeiro vencedor dessa vida. Obrigado pelos conselhos e por ter mostrado por meio de suas ações como não desistir dos nossos objetivos.

A todos os professores que passaram em minha vida me incentivando e me ensinando.

Especialmente as professoras Angelina, Maria Alice e Eliete que permitiram a utilização de equipamentos, materiais e espaço dos seus laboratórios. Agradeço a essas professoras por também permitirem a interação com seus orientados para trabalhos, parcerias e ajudas ao longo desses anos.

Aos amigos do LAFAB pelos anos de convivência, companheirismo e competência profissional.

Aos doutores do LAFAB “antigo” Papoti, Adelino, Fúlvia e Vanessa que ampararam todos os mestrandos e graduandos que passaram nesse laboratório por esses anos. Terei muitas saudades do LAFAB.

Aos graduandos e pós-graduandos do LAFAB “contemporâneo” (Ivan, Meireles, Pedro, Gláucio, Tam, Taísa, Luis, Manú, Wladimir, Murilo) que permitiram que eu aprendesse e participasse dos seus estudos. Para mim foi uma satisfação enorme conviver com pessoas de enorme gabarito e competência nesses anos. Obrigado a todos e sempre me lembrarei de vocês.

A dupla de amigos Beto e China pelo ensinamento técnico/laboratorial e pela paciência em ensinar os “MANÉS”. A Clarice pela paciência, amparo e apoio técnico de alta qualidade e eficiência nas análises.

Ao meu amigo Leonardo Coelho e Família pelo apoio, conselhos e acolhimento sempre que preciso.

Aos amigos de graduação pelo incentivo e por todos os momentos juvenis que fazem parte da vida.

Aos pilares da minha família, Domingos, Nair, Iolanda e Osmar por ter participado de toda minha vida com o amor único de vô e vó. Em especial ao meu avô Domingos (em memória) que até hoje continua sendo um exemplo de vida e homem.

Aos meus avós adotivos (Anésia, Augusto, Olinda e Alcides) por me mostrar que nessa vida o que realmente vale a Pena é Deus, Família e honestidade.

Aos meus pais que realmente investiram tudo de suas vidas em mim com muito amor e carinho. Amo muito vocês e obrigado por me ajudar, aconselhar, conversar em todos os momentos de alegria, conquistas e tristezas. Obrigado por me prepararem para o mundo me ensinando que só Deus é nosso refugio.

Ao meu sobrinho Samuel que após seu nascimento me fez enxergar o verdadeiro significado do amor “paterno”. Além disso, me trouxe a preocupação, dedicação e alegria **espontânea** para nosso lar.

A minha delicada e carinhosa sobrinha que amo muito e que me ajuda a ser criança e feliz quando estou ao seu lado.

A minha maravilhosa irmã que amo e admiro muito por sua inteligência, paciência e companheirismo.

Aos meus novos pais, meu sogro e minha sogra, que me aturam desde criança. Sou eternamente grato ao meu sogro e minha sogra por confiarem em um menino. Amo muito vocês e obrigado por toda confiança e dedicação concedida a mim.

A todos meus tios e primos por me ajudar a entender a verdadeira importância da Família.

Aos meus cunhadões que amo muito e que se enquadram além de cunhados em mais duas importantíssimas classificações: amigos e irmãos.

Por fim...

A pessoa mais importante da minha vida. A minha maravilhosa “RIQUE”. Não tenho palavras para agradecer sua paciência e seu amor nesses 8 anos passando por colegial, faculdade, pós-graduação ... Agradeço a Deus por colocar a Pri em minha vida como minha esposa. Agradeço a Pri por ser uma mulher excepcional, justa, dedicada, carinhosa e MARAVILHOSA e um pilar na minha vida. Te amo.

RESUMO

O objetivo foi avaliar antes, durante e após 4 modelos de treinamento (contínuo aeróbio, anaeróbio intermitente, periodizado linear e periodizado em blocos) as *performances* aeróbia e anaeróbia bem como as respostas de biomarcadores de *overtraining* em ratos *Wistar*. Os ratos (60 dias de idade) foram divididos em grupos: Controle/Sedentário, treinamento periodizado linear, periodizado em blocos, contínuo aeróbio e anaeróbio intermitente. Todos os animais foram avaliados por meio do teste de lactato mínimo para determinação da *performance* aeróbia (limiar anaeróbio – % do peso corporal- PC) e anaeróbia (Tempo de Exaustão a 13% do PC - seg – Tlim). Os protocolos de treinamento tiveram duração de 12 semanas e frequência de 6 dias/semana. O treinamento periodizado linear foi dividido em período Básico (6 semanas), Específico (4,5 semanas) e Polimento (1,5 semanas), tendo como estímulos intensidades equivalentes ao peso corporal dos animais (% do PC) variando entre 80 e 240% do limiar anaeróbio individual. O treinamento periodizado em blocos também foi dividido em três períodos com duração de 6 semanas (Bloco 1), 4,5 semanas (Bloco 2) e 1,5 semanas (Bloco 3) sendo que em cada bloco conteve os períodos básico, específico e polimento com intensidades equivalentes ao peso corporal dos animais (% do PC) variando entre 80 e 240% do limiar anaeróbio individual. O treinamento aeróbio realizou natação contínua com duração de 60 min/dia em intensidade correspondente ao limiar anaeróbio (100% do limiar anaeróbio) e abaixo do limiar anaeróbio (80 e 90%). O treinamento anaeróbio intermitente realizou 4 séries x 10 saltos com sobrecarga equivalente a 50% do PC. As análises bioquímicas, enzimáticas e hormonais bem como as variáveis de *performance* aeróbia e anaeróbia e supercompensação dos substratos energéticos (glicogênio muscular e hepático) foram analisadas antes do treinamento, após 6 semanas, 4,5 semanas e 1,5 semanas para os grupos periodizado linear e blocos. Para os grupos aeróbio contínuo 80 e 90% do limiar anaeróbio as avaliações foram realizadas a cada 4 semanas enquanto que para o treinamento anaeróbio intermitente a cada 6 semanas. Os resultados em todos os testes foram expressos em média \pm erro padrão e teve como procedimento estatístico os testes: ANOVA Three Way, com níveis de significância pré-fixado em $P < 0,05$. A *performance* anaeróbia mostrou significativos ganhos com o treinamento periodizado enquanto que a aeróbia obteve maiores valores com o treinamento anaeróbio. O treinamento aeróbio não alterou a *performance* aeróbia, mas reduziu a anaeróbia ao final de 12 semanas. Houve perda da *performance* aeróbia e anaeróbia no grupo sedentário o que pode ser atenuada principalmente com o treinamento periodizado e anaeróbio intermitente. Contudo, o desenvolvimento das *performances* aeróbia e anaeróbia mostrou ser dependente do modelo de treinamento aplicado. Em relação aos biomarcadores, as principais adaptações ocorreram no conteúdo de glicogênio hepático e do sóleo após o período de elevado volume. Além disso, as enzimas creatina kinase e lactato desidrogenase mostrou ser sensível aos períodos de treinamento assim como as concentrações de corticosterona. Por outro lado, as concentrações de creatinina, uréia, ácido úrico, superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase não apresentaram grandes alterações ao longo dos períodos de treinamento.

Palavras-chave: Treinamento, Ratos, Natação, Periodização, Lactato, Hormônios e Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine in rats the effects of 4 training models (endurance monotonous training, anaerobic intermittent training, linear periodization training and block periodization training) on anaerobic and aerobic performance, creatine kinase, muscle and liver glycogen, antioxidants and hormones. The rats (60 days old) were separated in: sedentary, endurance monotonous training, anaerobic intermittent training, linear periodization training and block periodization training groups. The aerobic and anaerobic performance was evaluated by lactate minimum test. The exercise groups were submitted to 6 day/wk, 12 wk. The endurance monotonous training was constant and equivalent to 100%, 90% and 80% of aerobic capacity determined by minimum lactate test. The anaerobic intermittent training had 4 sets x 10 jumps with a load corresponding to 50% of the body weight (bw). The linear periodized training was divided into Basic (6 weeks), specific (4.5 weeks) and taper (1.5 weeks), with intensities (% bw) ranging between 80 and 240 % of individual anaerobic threshold. The block training was divided into three periods lasting from 6 weeks (Block 1), 4.5 weeks (Block 2) and 1.5 weeks (Block 3) and in each block contained the basic periods, specific and taper with intensities (% bw) ranging between 80 and 240% of individual anaerobic threshold. The results in all tests were expressed as mean \pm standard error and had the statistical procedure tests: Three Way ANOVA, with significance levels prefixed at $P < 0.05$. The anaerobic performance improved after linear periodization training while aerobic capacity increased after anaerobic intermittent training. The endurance monotonous training did not affect aerobic performance, but reduced the anaerobic performance after 12 weeks. The aerobic and anaerobic decadence in the sedentary group was attenuated with linear periodization training and anaerobic intermittent training. The main changes in biomarkers occurred in hepatic and soleus glycogen after the period of high volume. Furthermore, the concentrations of creatinine, urea, uric acid, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase did not show significant alterations over the period of training.

Key words: Training, Rats, Swimming, Periodization, Lactate, Biomarkers.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 LIMIAR ANAERÓBIO.....	12
2.1.1 UTILIZAÇÃO DE MODELOS ANIMAIS NA FISIOLOGIA DO EXERCÍCIO E IDENTIFICAÇÃO DO LIMIAR ANAERÓBIO.....	14
2.2 TREINAMENTO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS.....	16
2.2.1 TREINAMENTO E ANTIOXIDANTES.....	18
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 OBJETIVO GERAL.....	21
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.1 ANIMAIS E TRATAMENTO.....	22
5.2 AVALIAÇÃO DA <i>PERFORMANCE</i> AERÓBIA E ANAERÓBIA (LACTATO MÍNIMO).....	25
5.3 TREINAMENTO.....	25
5.3.1 CLASSIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ESTÍMULOS APLICADOS DURANTE AS SESSÕES DE TREINAMENTO PERIODIZADO.....	25
5.3.2 TREINAMENTO PERIODIZADO LINEAR.....	26
5.3.3 TREINAMENTO PERIODIZADO BLOCOS.....	28
5.3.4 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO ESPECÍFICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DAS APTIDÕES AERÓBIA E ANAERÓBIA.....	29
5.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	29
5.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	32
6. RESULTADOS.....	33
7. DISCUSSÃO.....	35
8. CONCLUSÕES.....	39
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

10. APÊNDICES.....	47
10.1 PROTOCOLS FOR HYPERLACTATEMIA INDUCTION IN THE LACTATE MINIMUM TEST ADAPTED TO SWIMMING RATS.....	47
10.2 RESPOSTAS FISIOLÓGICAS PARA DETECTAR O <i>OVERTRAINING</i>.....	63
10.3 PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE TREINAMENTO PERIODIZADO EM NATAÇÃO UTILIZANDO RATOS WISTAR.....	98
10.4 EFFECTS OF ENDURANCE MONOTONOUS TRAINING IN RATS SUBMITTED TO SWIMMING EXERCISE.....	120
10.5 EFFECTS OF LINEAR PERIODIZATION TRAINING ON GLYCOGEN STORES, BIOMARKERS AND PERFORMANCE OF RATS.....	137
10.6 RESPOSTAS DE BIOMARCADORES DURANTE PERIODIZAÇÃO DO TREINAMENTO EM BLOCOS EM RATOS WISTAR.....	159
10.7 PERFORMANCE AND BIOMARKERS ADAPTATIONS DURING SWIMMING TRAINING BELOW THE ANAEROBIC THRESHOLD.....	177
10.8 PHYSIOLOGICAL ADAPTATIONS IN RATS SUBMITTED AN ANAEROBIC INTERMITTENT TRAINING.....	198

1. INTRODUÇÃO

A utilização de animais de laboratório no âmbito científico teve seu início constatado ao final do século XIX e começo do século XX observando-se uma ampla literatura envolvendo a pesquisa experimental até a atualidade (Total de 6.209,523 estudos, fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um levantamento de dados utilizando palavras isoladas (*Rat, animal*), inclui uma pesquisa heterogênea associando estudos comportamental-naturais e ecológicos de diferentes espécies até resultados experimentais controlados laboratorialmente (Tabela 1).

Palavras Pesquisadas	Número de Estudos	Ano de Publicação mais antigo
<i>Animal</i>	4.431,323	1916
<i>Animal Model</i>	377.462	1960
<i>Animal Training</i>	37.228	1963
<i>Animal Exercise</i>	18.973	1963
<i>Animal Training Exercise</i>	4.151	1965
<i>Rat</i>	1.269,080	1949
<i>Rat Training</i>	12.960	1965
<i>Rat Exercise</i>	7.244	1965
<i>Rat Training Exercise</i>	2.414	1965
<i>Exercise</i>	18.973	1963
<i>Training</i>	37.228	1963
<i>Exercise Training</i>	4.151	1965
TOTAL	6.209,523	

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (realizada 16/11/2009)

Dentre os modelos animais utilizados laboratorialmente (preás, coelhos, pombos, primatas, equinos e outros mamíferos), os ratos ganham destaque devido à aproximação sistêmico-fisiológico com outras espécies bem como com os seres humanos. Além disso, a facilidade de manipulação, reprodução, economia (comida, água, espaço) e melhor controle das respostas fisiológicas (sono e dieta), evidenciam essa cobaia na pesquisa biológica. Por esse motivo, desde 1949, inúmeros estudos com ratos (TOTAL: 1.269,080, fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) tem contribuído para pesquisas comparativas com seres humanos em áreas referentes à patologia, medicamentos, nutrição, psicologia entre outras. No

entanto, quando existe a interação com exercício e/ou treinamento, poucos resultados associam o modelo animal experimental com diferentes protocolos de treinamento correlacionando com a *performance*.

Segundo a base de dados científicos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, a inserção do exercício físico nesses animais iniciou em 1965 com o estudo de Wada *et al.* intitulado “*Influence of exercise and confinement on the activity of succinic dehydrogenase of cardiac muscle*”. Por outro lado, citações de outros trabalhos (HOLLOSZY, 1967; GLADDEN, 2004) relatam estudos mais antigos envolvendo adaptações fisiológicas ao exercício e vias energéticas em experimentação com animais (FLETCHER & HOPKINS, 1907; FISKE E SUBBAROW, 1925; HILL AND KUPALOV, 1929). A partir disso, estudos na fisiologia iniciaram as pesquisas no sentido de entender cada vez mais as respostas que o exercício promove em diferentes tecidos abrangendo atualmente adaptações a nível molecular (BONEN *et al.*, 2001). Contudo, devido às diferenças encontradas nas respostas fisiológicas dependentes da intensidade de esforço, iniciou-se outro ramo na fisiologia do exercício experimental, a padronização de protocolos de avaliação da capacidade física (PILIS *et al.*, 1993; LANGFORT *et al.*, 1996; GOBATTO *et al.*, 2001; deARAÚJO *et al.*, 2007).

A partir do entendimento dos sistemas energéticos aeróbio/anaeróbio e suas correlações com a intensidade do exercício, a aplicação de diferentes intensidades de esforço em ratos passou a ser uma ferramenta importante para comparação do metabolismo energético com seres humanos. Desse modo, o mesmo princípio encontrado em humanos a respeito da produção de lactato e determinação da predominância energética (transição metabólica aeróbia-anaeróbia) podem ser encontrados precisamente nesses animais (PILIS *et al.*, 1993; GOBATTO *et al.*, 2001; VOLTARELLI *et al.*, 2002).

A disponibilidade de pesquisa científica em relação à padronização de métodos de avaliação da capacidade física em ratos vem crescendo (GOBATTO *et al.*, 2008) o que facilita a prescrição de programas de treinamento com intensidades de exercício controladas e individualizadas. No entanto, ainda é escassa a prescrição e utilização de programas de treinamento nesses animais evidenciando a necessidade de investigações sistemáticas principalmente para testar os modelos de treinamento.

Mesmo existindo inúmeros estudos a respeito de programas de treinamento em seres humanos, existem dificuldades em definir qual o modelo (contínuo, intermitente, periodizado) mais eficaz para aumento da *performance* uma vez que inúmeros fatores extrínsecos podem interferir nesse controle (Figura 1).

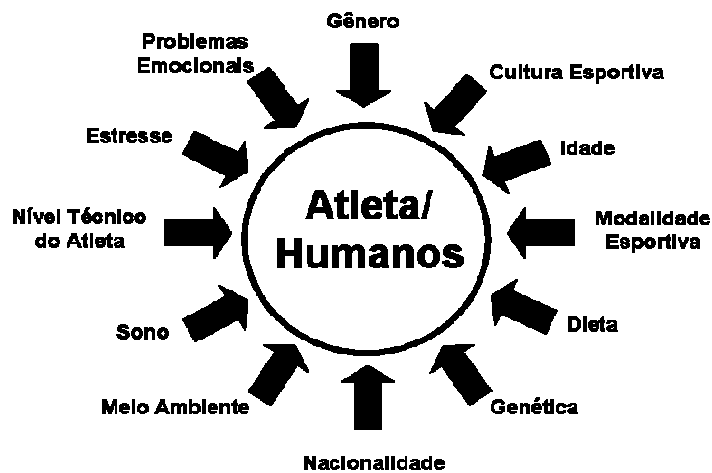


Figura 1. Possíveis diferenças metodológicas encontradas em diferentes estudos com treinamento físico aplicado em humanos.

Em estudos científicos envolvendo treinamento, por melhor controle metodológico, existe a dificuldade de comparações com outros trabalhos bem como para uma aplicação prática, pois cada estudo possui uma particularidade, público, fase do treinamento entre outras variáveis supracitadas.

Em ratos, a maioria desses fatores extrínsecos (genética, meio, nível físico, estresse, dieta, sono, gênero) pode ser controlada. Por esse motivo, a fisiologia do exercício experimental vem ganhando espaço nos últimos anos devido à similaridade das respostas fisiológicas encontrados em ratos bem como com a consistência das adaptações frente ao exercício físico. Logicamente, existem outras variáveis nas ciências do esporte tão importantes quanto à fisiologia do exercício (biomecânica, psicologia, tecnologia, nutrição) responsáveis diretamente pela melhora no rendimento físico, tornando ainda mais complexo e difícil de comparar e entender as diferentes adaptações orgânicas com os diversos protocolos de treinamento. No entanto, a utilização de animais de laboratório para estudar o comportamento fisiológico de diferentes modelos de treinamento aplicados no esporte de alto rendimento, é uma ferramenta imprescindível devido ao melhor controle e manipulações de variáveis extrínsecas bem como das respostas frente ao exercício respeitarem os mesmos princípios encontrados com humanos.

Em humanos, inúmeros estudos demonstram que um programa de treinamento que desconsidera os princípios da sobrecarga, adaptação e reversibilidade, pode desencadear o *overtraining* que é definido como: o acúmulo de cargas intensas de treinamento com recuperação inadequada que resulta em queda na *performance* bem como desequilíbrio psico-fisiológico (HALSON E JEUKENDRUP, 2004). Meeusen et al. (2006) *apud* Hohl et al.

(2009) definem *overtraining* como um contínuo processo de treinamento intensificado com a possibilidade de desencadear o *overreaching* funcional, *overreaching* não funcional e a síndrome do *overtraining*. Entre essas classificações, todas apresentam como principal sintoma a queda da *performance* mas indicam tempos de recuperação diferentes para cada processo:

Overreaching funcional → Caracteriza-se pela queda temporária na *performance* e necessita de um tempo de recuperação que varia dias ou semanas para restabelecimento da *performance*.

Overreaching não funcional → Caracteriza-se pelo *overreaching* extremo desencadenado queda ou estagnação da *performance*. Para restabelecimento da *performance* é necessário um maior período de tempo de recuperação em relação ao *overreaching* funcional que varia semanas ou meses.

Síndrome do *overtraining* → Para restabelecimento da *performance* é necessário um maior período de tempo de recuperação em relação ao *overreaching* não funcional que varia meses ou ano.

Assim como em humanos, não é qualquer tipo de treinamento físico que leva a resultados positivos em ratos uma vez que se deve considerar variáveis como volume, intensidade e recuperação (HOHL et al., 2009). Como descrito, associam o treinamento em ratos como sendo uma intervenção benéfica quando associada ao combate de doenças, dietas, medicamentos, técnicas laboratoriais e etc. No entanto, a aplicação de um programa de treinamento mal elaborado pode trazer respostas negativas a nível enzimático, tecidual e sistêmico o que pode influenciar inclusive em respostas clínicas. Desse modo, por mais que o foco do estudo dentro da fisiologia básica não seja o modelo de treinamento, não se pode desconsiderar os efeitos do exercício crônico nas adaptações orgânicas cobaias de laboratório.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIMIAR ANAERÓBIO

O lactato é um produto final da glicólise anaeróbia produzido principalmente durante exercício de alta intensidade pelo tecido muscular (BONEN et al., 2001). Esse metabólito pode ser oxidado na musculatura ativa ou transportado para a corrente sanguínea para ser removido em outras células e tecidos (THOMAS et al., 2005). Durante o esforço físico, existem inúmeras causas para o aumento da concentração sanguínea do lactato como, oferta insuficiente de oxigênio (O_2), glicólise acelerada devido maior concentração das catecolaminas e atividade enzimática (Lactato Desidrogenase e Fosfofrutoquinase), saturação nos mecanismos de lançadeiras de hidrogênio (H^+), vasoconstrição periférica atenuando a ligação do H^+ ao O_2 resultando em diminuição da oxigenação tecidual entre outros (GLADDEN, 2004).

A partir do conhecimento da relação entre concentração de lactato sanguíneo e exercício foi possível utilizar esse metabólito como indicador da intensidade de esforço (WASSERMAN e MCLLROY 1964; HECK et al., 1985; SNYDER et al., 1995). Como indicativo de esforço anaeróbio utiliza-se a concentração pico de lactato após exercícios exaustivos (TEGTBUR et al., 1993; SNYDER et al., 1995; HALSON e JEUKENDRUP, 2004). Para determinação da capacidade aeróbia o aumento abrupto da relação lactato versus intensidade de exercício representa o volume de O_2 durante o exercício acima do qual a ressíntese de energia aeróbia é complementada pelos sistemas anaeróbios (WASSERMAN e MCLLROY, 1964).

Dentre os diversos índices de avaliação fisiológica aeróbia, o LAn destaca-se por ser um indicador preciso, sensível a intervenções e de simples determinação da capacidade aeróbia. O termo LAn foi difundido por Wasserman e Mcllroy (1964) que o define como sendo o volume de O_2 durante o exercício acima do qual os substratos energéticos aeróbios são supridos por fontes energéticas anaeróbias, acreditando que o aumento abrupto das concentrações de CO_2 são acompanhados por acúmulo de lactato e redução abrupta no pH sanguíneo (Figura 2).

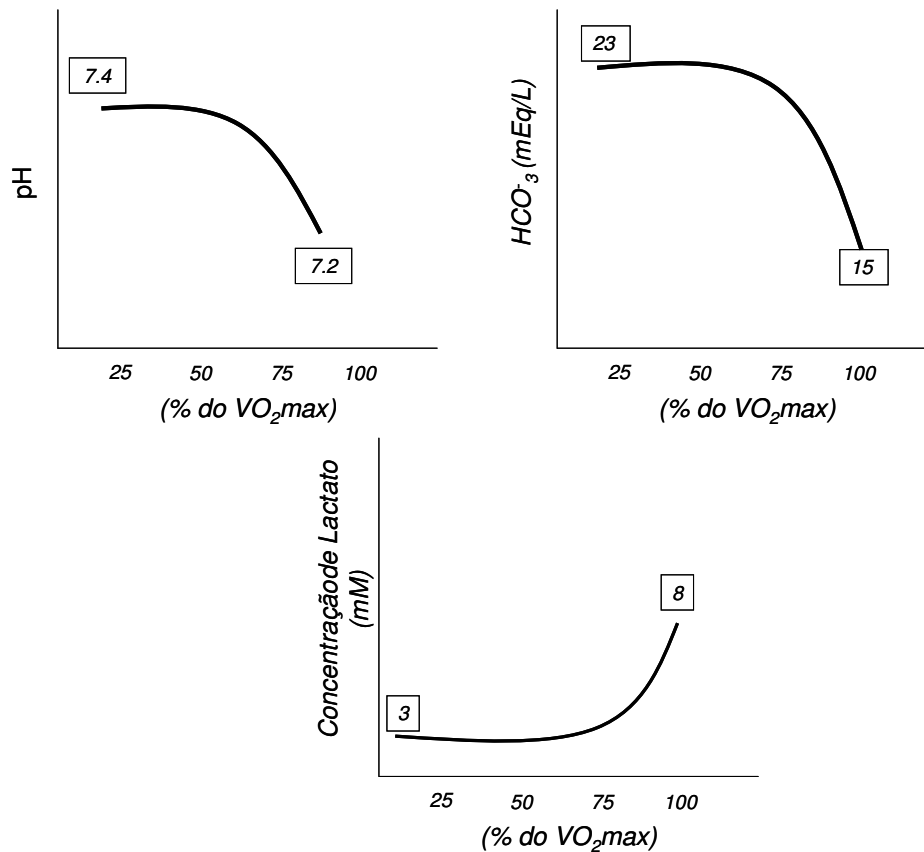


Figura 2. Aumento abrupto do lactato e diminuição concomitante dos valores de pH sanguíneo e bicarbonato durante a realização de um teste progressivo.

O aumento exponencial na produção de lactato em exercício com intensidades progressivas pode ser resultado de uma maior liberação desse metabólito pela musculatura (Fibras do Tipo II e translocação de MCT4) bem como menor remoção (diminuição de MCT1) devido a diminuição do fluxo sanguíneo para sítios de remoção, glicólise acelerada além de outros fatores (GLADDEN, 2004). O equilíbrio entre produção e remoção do lactato ocorre em intensidades de exercício correspondentes a 50% – 60% do VO_2 máx em indivíduos sedentários e 65%- 85% do VO_2 máx em indivíduos altamente treinados, sendo que, acima dessas intensidades a produção de lactato passa a ser maior que a remoção (MADER e HECK 1986).

Embora existam críticas quanto os métodos utilizados para determinação do LAn, a utilização do lactato sanguíneo é uma ferramenta sensível a pequenas alterações decorrentes do treinamento físico (PYNE et al., 2001). Por esse motivo, são crescentes o número de estudos que identificam o LAn por meio de diferentes protocolos (HECK et al., 1985; TEGTBUR et al., 1993). Entretanto, o teste de máxima fase estável de lactato é considerado o

protocolo padrão ouro para identificação da intensidade de exercício a qual ocorre equilíbrio entre produção e remoção do lactato (BILLAT et al., 2003).

Desse modo, foi encontrado na concentração de aproximadamente 4 mM de lactato a transferência energética do metabolismo aeróbio-anaeróbio em humanos (WASSERMAN et al., 1964; MADER et al., 1976; HECK et al., 1985). Todavia, em ratos Wistar essa transição metabólica parece ser protocolo dependente já que em ergômetro de natação a concentração de lactato esteve por volta de 5,5 mM (GOBATTO et al., 2001) e em esteira rolante o máximo predomínio aeróbio foi encontrado no valor de 4 mM, similar ao encontrado em seres humanos (PILLIS et al., 1993).

2.1.1 UTILIZAÇÃO DE MODELOS ANIMAIS NA FISIOLOGIA DO EXERCÍCIO E IDENTIFICAÇÃO DO LIMAR ANAERÓBIO

Dentre os ergômetros mais utilizados para simular estresse físico na fisiologia experimental se destacam a natação e a esteira rolante (GOBATTO et al., 2008). A natação apesar das críticas quanto à temperatura da água e estresse forçado, apresenta vantagens como o custo reduzido e boas respostas ao exercício por ser uma habilidade natural dos ratos. A esteira rolante é um ergômetro muito utilizado por ter a intensidade de esforço proporcional à velocidade, porém apresenta algumas críticas quanto ao custo elevado, alto número de animais para triagem, dificuldade de atingir velocidades máximas e em algumas vezes possui choque elétrico como estímulo para corrida.

Utilizando ambos os ergômetros, inúmeros estudos identificaram a transição metabólica em ratos utilizando lactacidemia (PILIS et al., 1993; LANGFORT et al., 1996; GOBATTO et al., 2002). Um dos primeiros estudos empenhados em identificar o LAn em ratos foi realizado por Gobatto et al. (1991) em natação. Esses autores realizaram teste incremental de natação submetendo um grupo de ratos Wistar a 4 esforços com duração de 5 minutos em intensidades correspondentes a 0, 5, 8 e 13% da massa corporal do animal. Ao término de cada estágio amostras sanguíneas foram coletadas para determinação da cinética lactacidêmica a qual apresentou comportamento linear e não exponencial impossibilitando a identificação do LAn.

Por outro lado, utilizando exercício de corrida em esteira, Pillis et al. (1993) determinaram o LAn em ratos em protocolo progressivo verificando que na intensidade de 25m/min foi encontrado o aumento exponencial do lactato na concentração de 4mM (LANGFORT et al. 1996).

No entanto, o protocolo de exercício que obteve sucesso na natação para identificação do LAn foi o de máxima fase estável de lactato (MFEL). Gobatto et al. (2001) observaram a

MFEL na concentração de 5,5 mM e nas cargas de 5 e 6% do PC. Além disso, esses autores constataram após 9 semanas de treinamento aeróbio, estabilização da lactacidemia na mesma concentração observada no início do estudo (5,5mM), porém com carga correspondente a 8% do PC. Esse estudo além de demonstrar a possibilidade de determinação da capacidade aeróbia em ratos, evidenciou sua sensibilidade aos efeitos do treinamento. No entanto, embora a metodologia proposta forneça precisamente a intensidade ideal para o desenvolvimento da capacidade aeróbia, são necessárias grandes quantidades de amostras sanguíneas bem como um grande período de tempo para execução do teste (aproximadamente 1 semana), prejudicando o planejamento das séries de treinamento impostas.

O teste de lactato mínimo é outro método que estima o LAn e permite no mesmo teste a avaliação de parâmetros aeróbio e anaeróbio. Essa metodologia foi proposta por Tegtbur et al. (1993) em humanos e consiste em induzir a lactacidemia com a realização de um exercício de alta intensidade por um curto período, após um período de repouso passivo (aproximadamente 8 minutos) inicia-se um exercício incremental com intensidades sub-limiáres e finalizando com intensidades supra-limiáres. Nos estágios iniciais de exercício, como a intensidade está abaixo do LAn a capacidade de remoção de lactato é maior que a produção, a medida que a intensidade aumenta, eleva-se também a produção da lactacidemia até obtenção de uma intensidade de exercício onde a produção é igual a remoção. Esse ponto é denominado Lactato mínimo (Lacm), pois é o menor valor de lactato observado depois de iniciado o exercício incremental.

Voltarelli et al. (2002) adaptou o protocolo de Tegtbur et al. (1993) para o modelo animal em exercício de natação. Inicialmente a aplicação desse método utilizando o modelo animal consistiu em induzir a hiperlactacidemia com a realização de 30 segundos de saltos com carga de 50% do PC seguido de 30 segundos de pausa totalizando 6 minutos de exercício. Após 9 minutos de intervalo passivo os ratos foram submetidos a um teste incremental com duração de 5 minutos e intervalo de 30 segundos para coleta de amostras sanguíneas (25µL) e determinação da lactacidemia. Esses autores identificaram a intensidade de lactato mínimo próximo a intensidade de máxima fase estável encontrado por Gobatto et al. (2001).

Assim, devido a similaridade das respostas orgânicas de ratos frente aos protocolos de avaliação adaptados de seres humanos, o programa de treinamento para esses animais pode ser construído com intensidades individualizadas e específicas para o desenvolvimento dos metabolismos aeróbio e/ou anaeróbio (GOBATTO et al., 2008). Basicamente, as manipulações das variáveis volume x intensidade do treinamento se correlacionam com os

sistemas energético aeróbio e anaeróbio. Por esse motivo, o LAn passou a ser muito utilizado para definir as zonas específicas do treinamento iniciando uma nova linha de pesquisa também na fisiologia experimental (BILLAT et al., 2003).

2.2 TREINAMENTO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS

A periodização do treinamento por possibilitar a maximização da *performance* e diminuição dos riscos de lesão e *overtraining* (FRY et al., 1992; ROWBOTTOM, 2003; STONE, 1990), é uma estratégia freqüentemente utilizada por técnicos de inúmeros esportes tais como: natação (PYNE et al., 2001), corrida (MARTIN & COE, 1997), treinamento de resistência (POLIQUIN, 1992), caiaque (AITKEN 1994), entre outros.

De modo geral a periodização do treinamento baseia-se na inter-relação das variáveis, volume e intensidade, que são ministradas dentro de um período de tempo pré-definido. Geralmente o final da periodização culmina com a “competição alvo” do planejamento. Uma ou duas semanas que precedem a competição, os atletas realizam o período de polimento que consiste na redução das cargas de treinamento a fim de provocar uma “supercompensação” dos substratos energéticos, que foram com freqüência estimulados a serem depletados em cada uma das sessões de treinamento intenso, resultando assim em aumento na *performance* (MAGLISCHO, 1988; 1999).

No entanto, o exercício quando praticado de modo intenso e sem períodos adequados de recuperação pode desencadear o *overtraining* no qual é caracterizado por uma série de distúrbios fisiológicos e metabólicos associados à redução da *performance* (HALSON & JEUKENDRUP, 2004).

Para o desenvolvimento da capacidade aeróbia, treinamentos com elevado volume e intensidades próximas ao limiar anaeróbio são os mais aplicados por utilizarem por um longo período o metabolismo energético aeróbio o qual resulta no aumento da extração de O₂ arterial (diferença a-vO₂) sem acúmulo de CO₂. O treinamento aeróbio acelera a atividade enzimática do ciclo de Krebs para formação de ATP aumentando a essa atividade na mitocôndria devido à disponibilidade do O₂ como acceptor de H⁺ ao final da cadeia de transporte de elétrons, mantendo assim a concentração de lactato estável por um longo período.

No entanto, o treinamento aeróbio mesmo não atingindo altos valores lactacidêmicos nem mesmo a exaustão, quando aplicado diariamente sem variações na intensidade bem como no volume diário desencadeia o *overtraining* resultando em estagnação ou queda na *performance* (FOSTER, 1998). Essa probabilidade de desencadear o *overtraining* em exercícios de *endurance* ocorre devido à monotonia das séries o qual impossibilita uma recuperação adequada para as séries subseqüentes (KUIPERS, 1998).

Pesquisas demonstraram que alterações no volume e intensidade do treinamento são acompanhadas por variações metabólicas e hormonais (ARMSTRONG, 1984; FLYNN et al., 1994; JANSSEN et al., 1986; MUJIKI et al., 1996a; MUJIKI et al., 1996b; MUJIKI et al., 2002; YAMAMOTO et al., 1988), sendo crescente o número de estudos que relacionam o comportamento desses parâmetros com as fases do treinamento e com a *performance* de atletas (COSTILL et al., 1991; TANAKA et al., 1993; HOOPER et al., 1995; HOOPER et al., 1999; HALSON & JEUKENDRUP, 2004).

Os biomarcadores hormonais, bioquímicos, imunológicos e hematológicos são utilizados como ferramenta para diagnosticar, tratar e prevenir o estado de *overreaching* funcional e *overtraining* o qual pode ser caracterizado como uma desordem fisiológica que acomete principalmente atletas causando redução do desempenho competitivo, incapacidade de manutenção das cargas de treinamento, fadiga crônica, desequilíbrios na homeostasia, enfermidades freqüentes e transtornos psicológicos (KUIPERS, 1998; HALSON & JEUKENDRUP, 2004). Ainda não há um consenso literário quanto ao melhor biomarcador para as diferentes fases do treinamento uma vez que é preciso associar uma gama de parâmetros para caracterizar de fato o *overreaching* funcional e *overtraining*.

Períodos com aumento abrupto no volume de treinamento de nadadores com intensidade de aproximadamente 95% do consumo máximo de oxigênio alteram significativamente as concentrações séricas de creatina quinase (CK) e cortisol, promovendo diminuição nas concentrações de testosterona e estagnação das catecolaminas plasmáticas e performances aeróbia e anaeróbia (KIRWAN et al., 1988; COSTILL et al., 1991).

Flynn et al. (1994) examinaram as repostas hormonais e bioquímicas durante uma temporada competitiva de corredores e nadadores, com mensurações sistemáticas das concentrações de testosterona (livre e total), cortisol e CK. Esses autores constataram alterações significativas nas concentrações de testosterona e CK ao longo do treinamento somente para o grupo de nadadores. No entanto, Maglisco (1999) alerta para cautela na utilização da CK como índice de *overtraining*, pois acredita que determinado aumento nos níveis sanguíneos dessa enzima possa ser uma resposta normal ao treinamento intenso e não um estado de *overtraining*. Já o cortisol não foi alterado em nenhum dos programas de treinamento estudados. Desse modo, esses autores concluíram que a testosterona pode ser um índice efetivo de *overtraining* em atletas. No entanto, grandes alterações no volume de treinamento foram necessárias para evidenciar mudanças significativas nesses parâmetros.

Considerando que indivíduos em *overtraining* apresentem catabolismo proteico (HALSON & JEUKENDRUP, 2004), espera-se que a formação de uréia e amônia esteja

aumentada. A uréia e amônia são compostos orgânicos formados pelo metabolismo final protéico e pode indiretamente indicar decomposição das proteínas musculares. Contraditoriamente, algumas pesquisas com atletas em *overtraining* não revelaram qualquer alteração nas concentrações desse metabólito (LEHMANN et al., 1992). No entanto, parece existir uma relação discreta somente entre o elevado volume de treinamento e o aumento da uremia (HALSON et al., 2003).

A realidade é que independente das ciclagens entre volume e intensidade e do método de treinamento empregado, o treinamento ideal é aquele que alcança ou supera os objetivos propostos inicialmente. No entanto, para que esse resultado seja obtido, o controle de alguns parâmetros fisiológicos, bioquímicos e imunológicos em associação com as variáveis neuromusculares e psicológicas parece ser uma ferramenta importante como monitoramento do treinamento.

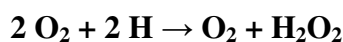
Muitos marcadores bioquímicos de estresse citados anteriormente podem ser alterados quando o atleta já apresenta um estado de *overtraining*, o que evidência uma possível limitação desses parâmetros (MACKINNON et al., 1997) e a necessidade de métodos mais sensíveis para monitorar e prevenir o estresse e o excesso de treinamento.

Desse modo, análises enzimáticas, moleculares e histológicas começaram a ser implementadas na ciência do treinamento esportivo. Autores têm relacionado estados de *overtraining* com aumento de estresse oxidativo associado à diminuição do desempenho, fadiga muscular e danos musculares.

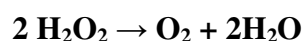
2.2.1 TREINAMENTO E ANTIOXIDANTES

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas principalmente durante o exercício e apresentam grande capacidade reativa resultando em inúmeros danos celulares. Dentre as EROs o radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) é a partícula precursora para que outras moléculas oxidativas sejam formadas. O radical superóxido pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) principalmente pela ação catalítica da enzima superóxido dismutase (SOD).

A SOD tem como principal função reduzir as espécies reativas de oxigênio combatendo principalmente a ação do radical superóxido.



Somente após a ação da SOD é que a enzima Catalase consegue agir varrendo efetivamente o peróxido de hidrogênio formado em moléculas de água e oxigênio.



As enzimas glutathiona reductase e glutathiona peroxidase estão envolvidas no combate as espécies reativas de oxigênio endógeno e geralmente encontram-se aumentadas em estados elevados de estresse oxidativo. A glutathiona é derivada de aminoácidos (cisteína, ácido glutâmico e glicina) sendo um importante catalisador de radicais hidroxila ($\text{HO}\bullet$) e peróxido lipídico ($\text{COOH}\cdot$). Mesmo com ações efetivas no fígado, essas enzimas exercem um papel importante na desintoxicação de derivados formados durante a via aeróbia em tecidos como coração, pulmão, cérebro e músculos. No entanto, a glutathiona peroxidase dependente de selênio liga-se facilmente ao peróxido de hidrogênio formando álcool e posteriormente ácido selênico. Além disso, a glutathiona peroxidase atua na catalisação do peróxido de hidrogênio enquanto que a glutathiona reductase age na utilização de elétrons do NADPH (Figura 3).

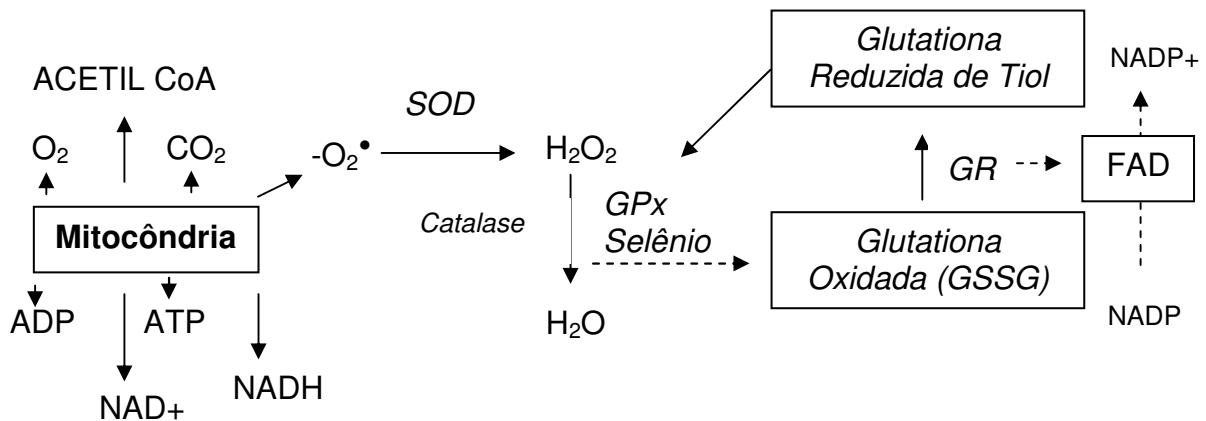


Figura 3. Esquema de ação da Glutathiona peroxidase e glutathiona reductase no combate as espécies reativas de oxigênio formado durante a via aeróbia. A GPx possui uma ação mais efetiva por iniciar o ciclo da glutathiona no combate aos radicais livres.

Estudos clínicos evidenciaram aumento de ânions superóxido (QUINDRY et al., 2003), aumento de nitração e carbonilação de proteínas (RADAK et al., 2003), quimioluminescência urinária (SOUZA Jr et al., 2005), peroxidação lipídica (GROUSSARD et al., 2003) e redução da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e superóxido dismutase (GROUSSARD et al., 2003) em exercícios intensos. Estudos experimentais que avaliaram os efeitos do treinamento em esteira rolante (PRADA et al., 2003) e na natação com intensidade equivalente a máxima fase estável de lactato, verificaram aumento de estresse oxidativo e redução da atividade da catalase circulantes (PRADA et al., 2004), porém esses modelos de treinamento não simularam protocolos de treinamento aplicados em humanos como a periodização a qual poderia modular com mais eficiência o sistema antioxidante.

3. JUSTIFICATIVA

O presente estudo justifica-se pela necessidade de utilizar a fisiologia básica para investigar experimentalmente questões relacionadas ao esporte, como é o caso dos métodos de treinamento utilizados atualmente, a partir da adaptação e padronização de protocolos para determinação da capacidade aeróbia (GOBATTO et al., 2001; VOLTARELLI et al., 2002). Embora exista uma vasta literatura sugerindo diversas maneiras de se periodizar o treinamento (VERKHOSHANSKY, 1990; MANSO et al., 1996; MATVEEV 1996, 1997; DANTAS, 1998; BOMPA, 1999; WEINECK, 1999; ELLIOT E MESTER, 2000; DE LA ROSA, 2001), ainda é escasso o embasamento científico que justifique a utilização de alguns modelos (FRY et al., 1992), provavelmente pela inviabilidade da implementação de novos métodos de treinamento no ambiente competitivo, que muitas vezes fogem do domínio do técnico e/ou preparador físico. Outro aspecto limitante para esse tipo de investigação com atletas, principalmente de alto nível é o denso calendário competitivo e os contratos com patrocinadores, exigindo assim um elevado rendimento dos atletas quase que semanalmente ao longo de uma temporada competitiva.

Na fisiologia experimental, são crescentes os estudos que verificam a influência do treinamento físico em modelos animais, sobre efeitos de esteróides anabólicos, aspectos morfológicos e metabólicos em ratos diabéticos, suplementação, biomarcadores além de outros. No entanto, somente alguns se preocuparam em investigar os métodos de treinamento contínuos, intermitentes ou periodizado visando o desenvolvimento da aptidão aeróbia e anaeróbia.

Desse modo, aceitamos ser possível maximizar os efeitos do treinamento em modelos animais e avalia-los com o desenvolvimento das capacidades aeróbia e anaeróbia em um único programa de treinamento. Além disso, entendemos ainda ser possível, a partir do modelo de periodização proposto em ratos, iniciar uma nova linha de pesquisa empenhada em investigar e otimizar os diversos modelos de treinamento utilizados atualmente na fisiologia experimental.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Aplicar quatro protocolos de treinamento em natação de 12 semanas em ratos Wistar (2 contínuos e 2 periodizados) e monitorar a *performance* aeróbia e anaeróbia pelo teste de lactato mínimo bem como as variáveis fisiológicas por meio de análises bioquímicas, hormonais e de estresse oxidativo.

4.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o protocolo de lactato mínimo em ratos para determinação da capacidade aeróbia e anaeróbia;
- Revisar a literatura a respeito das principais respostas fisiológicas que acometem o *overtraining*;
- Aplicar 3 protocolos de natação em intensidades contínuas aeróbias correspondentes a 100%, 90% e 80% do Limiar Anaeróbio determinado pelo teste de lactato mínimo;
- Aplicar um treinamento anaeróbio intermitente com sobrecarga correspondente a 50% do peso corporal (aproximadamente 1000% do Limiar Anaeróbio);
- Desenvolver dois programas de treinamento periodizado (Linear e Blocos), alterando as variáveis volume e intensidade em períodos básico, específico e de polimento.
- Comparar valores de parâmetros hormonais (Corticosterona e Testosterona), musculares (Glicogênio sóleo e gastrocnêmio), hepáticos (Glicogênio), biomarcadores de estresse oxidativo plasmático (Catalase, Glutathione Peroxidase, Superoxido Dismutase e Grupamentos Sulfidril), nos diferentes grupos experimentais, no início do experimento e após cada período de treinamento.
- Determinar qual dos protocolos utilizados obtiveram melhor *performance* aeróbia e anaeróbia e supercompensação energética verificado ao final da 12^a semana.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados um total de 390 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus Novergicus*), com aproximadamente 60 dias de idade, pesando aproximadamente 250 gramas no início do experimento. Os animais foram provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu e foram tratados no biotério central da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro. A realização dos experimentos seguiu as resoluções específicas (Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979; e Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934).

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, não excedendo 5 ratos por gaiola, em ciclo de luz claro/escuro de 12/12 horas. Todos os animais receberam ração comercial e água “*ad libitum*”. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos:

- controle (n= 130);
- contínuo aeróbio (n=70);
- intermitente anaeróbio (n=20);
- periodização linear simples (n=60);
- periodização por blocos (n=30);
- padronização do teste de lactato mínimo em ratos (n=80).

Previamente aos programas de treinamento, todos os ratos realizaram um período de 2 semanas de adaptação, que constituiu de natação com 5 minutos de duração e frequência de 5 dias.semana⁻¹. Esse procedimento foi adotado para minimizar possíveis influências de fatores estressantes decorrentes da manipulação dos ratos ao longo do treinamento.

Dez ratos do grupo controle (GC) foram sacrificados após duas semanas de adaptação para determinação inicial (Linha de Base) dos parâmetros hormonais, musculares, hepáticos, biomarcadores de estresse oxidativo. Os animais restantes do GC, para cada grupo, foram sacrificados em lotes de 10 de acordo com cada fase de treinamento. A eutanásia foi feita após aplicação de anestésico (Ketamina/Xylazina).

Os programas de treinamento tiveram a duração de 12 semanas, com frequência de treinamento de 6 dias.semana⁻¹. Os animais realizaram exercícios de natação com temperatura da água mantida a 31 ± 1 °C, em tanques cilíndricos com dimensões de 80x120cm com nível da água estando aproximadamente a 110 cm. Com o objetivo de evitar interferência no padrão

de nado dos animais, o tanque foi dividido por tubos PVC com dimensões de 24,5x120cm em 4 compartimentos de modo que os ratos nadem individualmente (Figura 4).

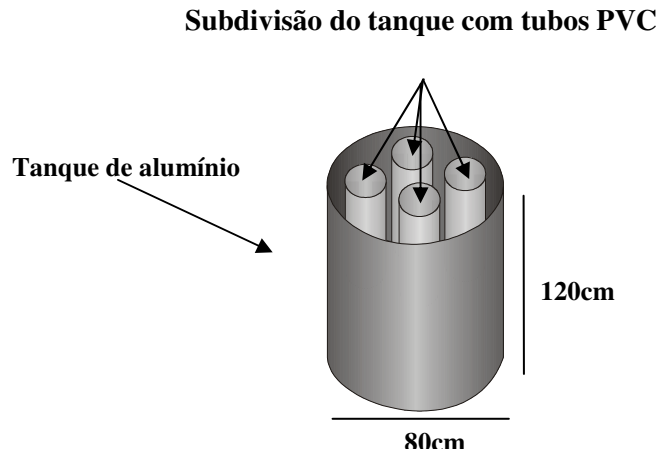


Figura 4. Tubos de PVC colocados dentro do tanque de alumínio, para minimizar possíveis influências no padrão de movimento dos ratos quando submetidos ao exercício natação.

Metodologicamente, o experimento foi realizado em 4 momentos distintos:

1º Momento: Padronização do Teste de Lactato Mínimo em ratos;

2º Momento: Aplicação do Treinamento contínuo aeróbio na intensidade correspondente a 100% do Lactato Mínimo e aplicação do treinamento periodizado linear (piloto);

3º Momento: Execução dos treinamentos contínuo aeróbio nas intensidades de 80 e 90% do Lactato Mínimo e do treinamento anaeróbio intermitente;

4º Momento: Execução dos treinamentos periodizado linear e blocos.

Em todos os experimentos foram analisados laboratorialmente glicose sérica, concentração de lactato, creatina quinase, glicogênio muscular (sóleo e gastrocnêmio), glicogênio hepático, uréia sérica, creatinina, testosterona, corticosterona, ácido úrico, sulfidrilas totais, glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase, ao longo de todo experimento nos diferentes protocolos como mostra o Esquema Experimental abaixo.

Com o objetivo de neutralizar os efeitos agudos das sessões de treinamento 24 horas previamente a eutanásia, os animais permaneceram em repouso nas gaiolas.

5.2 AVALIAÇÃO DA *PERFORMANCE* AERÓBIA E ANAERÓBIA (LACTATO MÍNIMO)

A *performance* aeróbia e anaeróbia foi avaliada ao final de cada fase de treinamento destacado no desenho experimental supra-citado por meio do teste de lactato mínimo o qual permitiu a determinação da capacidade aeróbia e do tempo limite (Tlim). Cabe ressaltar que o teste de lactato mínimo foi inicialmente padronizado e aplicado em cada fase de todos os treinamentos (APÊNDICE 1).

As *performances* aeróbia e anaeróbia foram assumidas como intensidade de lactato mínimo (LM) e tempo limite (Tlim). Para determinação dessas variáveis, foi utilizado o protocolo de lactato mínimo (LM) validado por Tegtbur et al. (1993) em humanos, aplicado a ratos por Voltarelli et al. (2002).

O procedimento de avaliação da *performance* anaeróbia serviu como método para indução da hiperlactacidemia com uma carga correspondente a 13% do PC. Os animais realizaram 2 esforços nessa primeira fase do teste sendo o primeiro com duração de 30 s e após intervalo de 30 s, a realização do segundo esforço na mesma carga até exaustão (Tlim). Amostras sanguíneas (25µL) foram coletadas da extremidade distal da cauda aos 1, 3, 5, 7 e 9 min após o Tlim para determinação da concentração pico de lactato (mmol.L⁻¹).

Imediatamente após 9 minutos de intervalo passivo, os ratos foram submetidos a um teste incremental para determinação da intensidade de lactato mínimo (*performance* aeróbia) correspondente ao equilíbrio entre remoção e produção do lactato. As cargas foram equivalentes a 4,0- 4,5- 5,0- 5,5- 6,0 e 7,0% do peso corporal (PC) de cada animal. Cada estágio do protocolo progressivo foi composto por 5 minutos de duração com intervalo de 30 s para determinação da lactacidemia. A relação obtida entre a concentração de lactato e a carga (porcentagem do peso corporal) foi ajustada por uma equação polinomial de ordem 2, sendo que lactato mínimo foi considerado a derivada zero desse ajuste.

5.3 TREINAMENTO

5.3.1 CLASSIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ESTÍMULOS APLICADOS DURANTE AS SESSÕES DE TREINAMENTO PERIODIZADO

As intensidades de nado utilizadas durante o treinamento, foram definidas com base nas porcentagens dos valores de lactato mínimo (LM) e quantificadas com base nos estudos de Mujika et al. (1995). As terminologias utilizadas para padronizar os estímulos aplicados nesse estudo foram adaptadas das nomenclaturas proposta por Maglischo (1999), e foram

divididas em séries de treinamento objetivando o desenvolvimento da aptidão aeróbia e anaeróbia. O treinamento aeróbio foi subdividido em 3 níveis: Aeróbio - 1 (A-1), Aeróbio - 2 (A-2) e Aeróbio - 3 (A-3). De modo geral, as séries de A-1 compreenderam exercícios contínuos com duração de aproximadamente 60 minutos e realizados com intensidades de 80% do Lactato Mínimo. Foram classificadas como séries de A-2, os nados contínuos realizados na intensidade correspondente ao Lactato Mínimo com duração de aproximadamente 30 minutos. Os esforços de A-3 compreenderam os nados intervalados: 3 séries com duração de 5 minutos e 1 minuto de pausa passiva, com intensidades de 120% do Lactato Mínimo. O treinamento com o objetivo de desenvolver a aptidão anaeróbia (ANA-1) foi representado por 5 esforços intervalados com duração de 1 minuto e pausa de 1 minuto em intensidade correspondente a 13% da massa corporal.

A carga semanal total de treinamento (CST) correspondeu à somatória dos estímulos de treinamento, que foi obtido pelo produto do tempo de esforço (t) e a intensidade relativa (%) ao LA (Equação 1).

$$CST = (t_1 \cdot \%PC_1) + (t_2 \cdot \%PC_2) + (t_3 \cdot \%PC_3) + \dots$$

Equação 1. Determinação da carga semanal total de treinamento apresentado em unidades arbitrárias (U.A.).

5.3.2 TREINAMENTO PERIODIZADO LINEAR

O grupo periodizado linear realizou um programa de treinamento experimental com a duração total de 12 semanas, dividida em períodos conforme proposto por Maglischo (1999):

- preparatório básico (PPB);
- período específico (PPE);
- polimento (PP).

O período preparatório básico (PPB) teve a duração de seis semanas sendo composto por estímulos intercalados de A-1, A-2 e A-3 e um tempo médio de exercício de aproximadamente 45 min diários. No período preparatório específico (PPE) a duração foi de quatro semanas e meia com o tempo médio de nado reduzido em aproximadamente 31% enquanto que a intensidade sofreu um incremento de aproximadamente 43% com a implementação de esforços de ANA. Após estas duas fases, foi realizado o período de polimento (PP) que teve duração total de uma semana e meia. Esse consistiu na diminuição progressiva e não linear de 69% no volume e de 22% na intensidade em relação aos PPB e PPE respectivamente. No entanto os estímulos de treinamento (A-1, A-2, A-3 e ANA-1) foram mantidos durante a realização desse período (Figura 5).

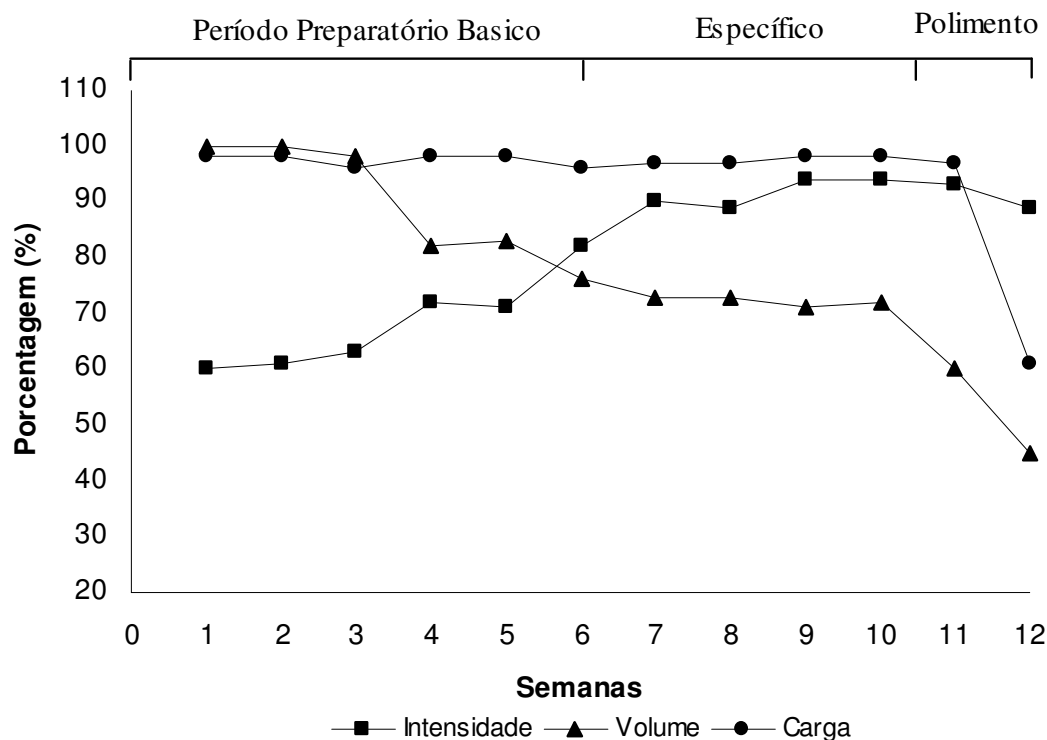


Figura 5. Comportamento das variáveis, volume, intensidade e carga ao longo durante os períodos preparatório básico (PPB), específico (PPE) e polimento (PP) ao longo de uma periodização linear.

5.3.3 TREINAMENTO PERIODIZADO BLOCOS

O treinamento periodizado experimental em blocos teve a duração total de 12 semanas e foi dividido em três blocos distintos (B-1, B-2 e B-3).

O B-1: duração de 6 semanas sendo composto por estímulos intercalados de A-1, A-2, A-3 e ANA e um tempo médio de exercício de aproximadamente 45 min diários. O B-1 teve a implementação de todos os períodos básico, específico e polimento num prazo de 6 semanas.

O B-2 teve a duração de quatro semanas e meia com o tempo médio de nado reduzido em aproximadamente 31% enquanto que a intensidade sofreu um incremento de aproximadamente 43% com a adição de esforços realizados em ANA. Após esse período foi realizado o B-3, que teve como objetivo de promover a manutenção do “pico” de performance dos animais obtidos ao final do B-2. No entanto todos os estímulos de treinamento (A-1, A-2, A-3 e ANA-1) foram mantidos durante a realização desse período (Figura 6).

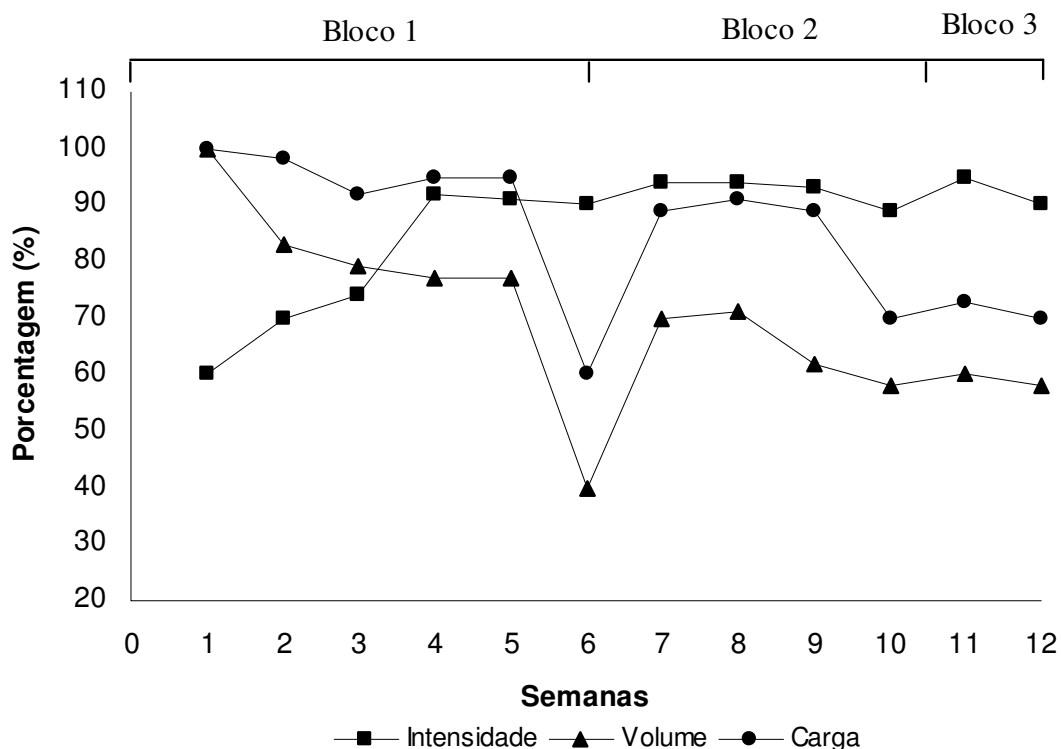


Figura 6. Comportamento das variáveis, volume, intensidade e carga ao longo durante os ao longo dos respectivos ciclos (B-1, B-2 e B-3) de treinamento de uma periodização experimental em blocos.

5.3.4 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO ESPECÍFICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DAS APTIDÕES AERÓBIA E ANAERÓBIA

Para o desenvolvimento da aptidão aeróbia e anaeróbia foram adotados os protocolos de natação contínua e intermitente, comumente utilizados no treinamento de ratos. O treinamento contínuo visando o desenvolvimento da aptidão aeróbia consistiu na realização de até 1 hora de exercício de natação com carga correspondente ao Lactato Mínimo (100%) e abaixo a intensidade de Lactato Mínimo (80 e 90%). O treinamento para o desenvolvimento da aptidão anaeróbia consistiu na realização de 4 séries de 10 saltos com os ratos suportando cargas equivalente a 50% da massa corporal separados por intervalo de 1 minuto entre as séries (SILVA et al. 1999; ROGATTO & LUCIANO, 2001; ROGATTO et al. 2003; TOTON et al., 2001).

Apenas o protocolo de treinamento aeróbio 100% do LAn (Figura 7) foi avaliado no início e ao final de 12 semanas. O treinamento contínuo aeróbio a 80 e 90% do LAn foi avaliado a cada 4 semanas (Desenho Experimental 2). O grupo anaeróbio intermitente foi avaliado no início do treinamento, após 6 semanas e após 12 semanas (Figura 7).

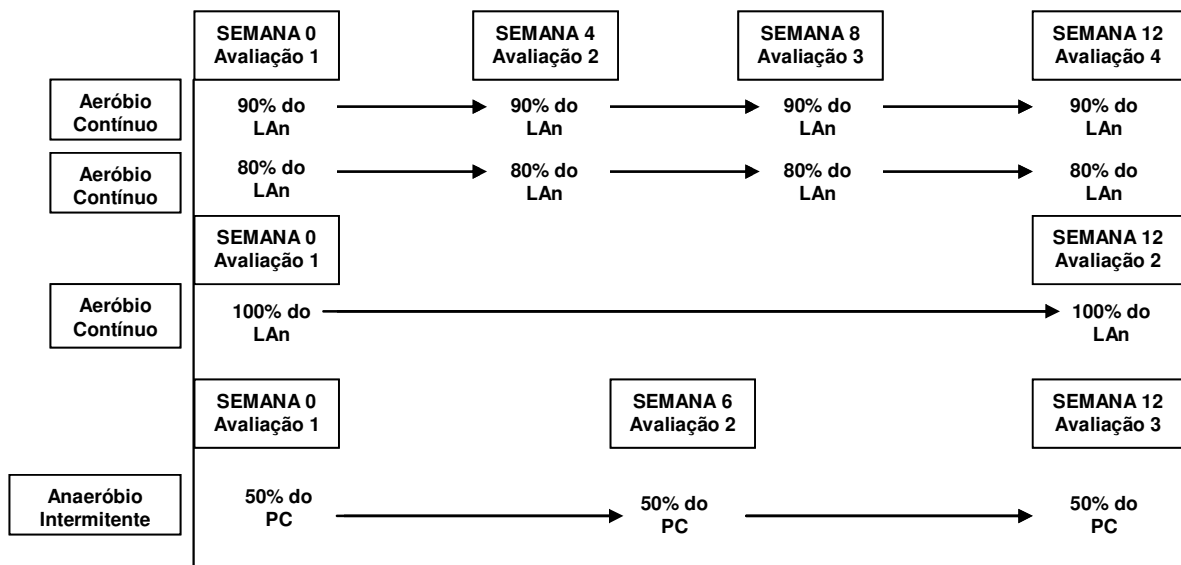


Figura 7. Treinamento contínuo aeróbio e anaeróbio realizado em diferentes intensidades constantes e seus respectivos períodos de avaliação. Avaliações momentâneas para determinação do Lactato Mínimo e dos parâmetros hormonais, musculares, hepáticos e biomarcadores de estresse oxidativo.

5.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Concentração de Lactato

Foram coletados 25µl de sangue da extremidade caudal do rato por meio de capilares heparinizados e calibrados, os quais foram imediatamente transferidos para tubos de

microcentrifuga contendo 400µl de ácido tricloroacético 4% (TCA), para a desproteinização do sangue. Em seguida foi agitado e centrifugado, para a retirada de 100µl do sobrenadante, que foi transferido para tubos de ensaio, no qual foi adicionado 500µl de reativo preparado a base de Estoque de glicina / EDTA 50mL e Hidrazina Hidrato 1,2mL, 100mg de NAD (Beta-Nicotinamide Dinucleotide SIGMA) e 150µL de LDH (L-Lactic Dehydrogenase bovine heart – 1000 units/mL SIGMA) a pH 8,85. As amostras foram agitadas e incubadas durante 20 em Banho- Maria mantido a 37°C. A concentração de lactato foi medida a 340nm contra a curva de calibração (ENGEL E JONES, 1978).

Glicogênio muscular (Sóleo e Gastrocnêmio)

Frações pesando entre 200-250mg do músculo sóleo foram retiradas imediatamente após a eutanásia e foram digeridas em 0,5 mL de KOH 1N durante 20 minutos. Posteriormente, foram adicionadas 20µL de solução saturada de Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado por meio de duas passagens de 2,5mL de etanol fervente, seguida de centrifugação. A determinação colorimétrica foi realizada com a adição de 20µL de fenol a 80% e 2,0mL de ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro 490nm (DUBOIS et al., 1956).

Glicogênio Hepático

As diferenças na determinação do glicogênio hepático, em relação ao tecido muscular, foram as seguintes: as frações de tecido hepático retirado após a eutanásia pesaram aproximadamente 500mg, portanto, com necessidade de digestão em 2mL de solução KOH 30%. A precipitação do glicogênio hepático foi realizada em 0,1 mL de Na₂SO₄ e 7mL de etanol. Após a extração o precipitado foi suspenso em 25mL de água ionizada. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro 490nm (Dubois et al., 1956).

Para todas as análises a abaixo que envolveram a análise do soro ou plasma, o sangue foi coletado por punção cardíaca, após toracotomia, sempre de 24h após o término dos testes de lactato mínimo.

Creatina Quinase – NAC (CK)

Para mensuração da atividade plasmática da Creatina Quinase-NAC, foram realizadas análises utilizando-se o kit "Laborlab CK NAC-ativado". O cálculo da atividade de CK (U/L) na amostra será feito pela equação $CK_p = 8035 \times \Delta\text{absorbância}/\text{minuto}$.

Uréia

Para determinação da uréia sérica foi utilizado o método enzimático por meio do kit Laborlab® (CAT N° 02800). Para análise foi necessário 10 µL de amostra (soro ou plasma) adicionados em 1mL de reativo de trabalho a base de TRIS pH 7,8 120 mmol/L, 2-Oxoglutarato 7 mmol/L, ADP 0,6 mmol/L, Urease > 6 KU/L, GLDH > 1 KU/L e NADH. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm ajustando o zero do aparelho com o branco (NOGUEIRA et al., 1990).

Creatinina

Para a determinação de creatinina foram separados 100µL da amostra de soro e adicionadas a 1 mL de reagente (Solução de Ácido Pícrico 41,4 mmol/L, Solução de Glicina - NaOH 1 mol/L e Solução Ácida) para posterior determinação da absorbância em 510 nm aos 30 e 90 segundos (Kit Bioclin N° K067).

Testosterona

Para determinação dos níveis de testosterona, foram utilizados 50µL de soro e posteriormente aplicado a técnica do kit *Coat-A-Count* -radioimunoensaio de fase sólida, baseado nos anticorpos específicos à testosterona imobilizados nas paredes dos tubos de polipropileno. Por esse método, a testosterona marcada com ^{125}I (105ml) compete por um período fixo de tempo com a testosterona da amostra do participante para os sítios do anticorpo. O tubo foi decantado para separar a forma ligada da livre, e analisado em um contador gama. A quantidade de testosterona presente na amostra do foi determinada a partir de uma única curva de calibração. Os calibradores foram respectivamente, 0, 20, 100, 400, 800, 1600 nanogramas de testosterona por decilitro (ng/dL) no qual foram pipetados 50µl do calibrador zero, 50µl de cada calibrador remanescente e de amostras dos animais (soro) nos tubos preparados. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de testosterona total ^{125}I em todos os tubos para posterior agitação em vórtex. As amostras foram incubadas por 3 horas à 37°C e decantadas após este período removendo todo o líquido remanescente. Cada tubo foi contado 1 minuto em contador gama (Gênese kit®).

Corticosterona

Foram utilizados 25µL de soro para a determinação da corticosterona por meio de kit específico *Coat-A-Count*-radioimunoensaio de fase sólida em que a corticosterona marcada com ^{125}I (105ml) compete durante um período de tempo fixo com a corticosterona na amostra por locais de fixação de anticorpos. O anticorpo é imobilizado contra a parede de um tubo de polipropileno, decantar o sobrenadante para concluir a competição e isolar a fração ligada ao anticorpo da corticosterona marcado radioativamente. Após a análise do tubo num contador gama, foi possível a determinação da concentração sanguínea através de uma curva de calibração. Os calibradores tiveram respectivamente 0, 1, 5, 10, 20 e 50 microgramas de corticosterona por decilitro (µg/dL) em soro humano processado. As amostras foram incubadas por 45 minutos a 37°C e decantadas completamente, removendo-se toda a umidade visível. Cada tubo foi contado durante 1 minuto em contador gama (Gênese Kit®).

Concentração de Ácido Úrico

As análises para determinação da concentração de ácido úrico no plasma foram conduzidas de acordo com o Kit específico Laborlab®.

Grupamento Sulfidrilal totais em plasma e Atividade Plasmática da Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e Catalase

Uma alíquota de 50 µl do plasma foi misturada em 1 ml de tampão Tris-EDTA (1mM), com a primeira leitura sendo feita a 412 nm (leitura A₁). Após essa leitura foi adicionado 20 µl de 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 10mM, diluído em metanol. Após um período de 15 minutos foi realizado uma nova leitura (leitura A₂). O branco (B) conteve somente DTNB e tampão Tris-EDTA. Os grupamentos sulfidrilal totais foram calculados usando o coeficiente de absorção molar=13,600 cm⁻¹M⁻¹ (Faure & Lafond, 1995) onde (A₂-A₁-B) x 1,57mM.

Atividade plasmática da Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada utilizando Kit comercial EIA Cayman Chemical Assay® (706002) utilizando método xantina e xantina oxidase. A absorbância de leitura foi de 460 nm.

A atividade plasmática da Glutathione Peroxidase (GPx) foi determinada utilizando Kit comercial EIA Cayman Chemical Assay® (703002). Na presença da glutathione redutase e NADPH, a glutathione foi imediatamente oxidada e convertida para NAD⁺. Para leitura foi utilizado absorbância de 340 nm a cada 5 minutos.

A atividade da Catalase foi mensurada EIA Cayman Chemical Assay[®]. As amostras foram misturadas em reagentes contendo Buffer, Padrão de Formaldeído, KOH, Metanol, Peróxido de Hidrogênio, periodato de potássio. A absorbância utilizada foi de 540 nm.

5.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As variáveis dependentes contidas em todas as etapas propostas no presente estudo foram submetidas ao teste de normalidade utilizando o Teste W de Shapiro-Wilk.

As respostas obtidas ao longo dos períodos de treinamento foram analisadas pelo teste de variância ANOVA *Two-Way*, quando necessário, pelo teste de post-hoc de *Newman Keuls* para as variáveis consideradas normais pelo teste de normalidade (análise paramétrica). Excepcionalmente, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo método de Dunn, em análise não paramétrica. Em todos os testes estatísticos utilizados em cada uma das etapas da presente tese, o nível de significância foi pré-fixado em $P < 0,05$ (DAWSON-SAUNDERS e TRAPP, 1994).

6. RESULTADOS

Os resultados da presente tese foram subdivididos em 8 apêndices os quais estão apresentados sob a forma de artigo científico.

Anteriormente a aplicação dos diferentes modelos de treinamento foi padronizado o teste de lactato mínimo em ratos (APÊNDICE 1) o qual foi utilizado para avaliação da capacidade aeróbia e anaeróbia dos animais em todas as fases do treinamento.

APÊNDICE 1. Título: PROTOCOLS FOR HYPERLACTATEMIA INDUCTION IN THE LACTATE MINIMUM TEST ADAPTED TO SWIMMING RATS.

Posteriormente a padronização da intensidade de exercício em ratos por meio do teste de lactato mínimo, a literatura foi revisada com intuito de aprofundar/entender algumas respostas laboratoriais e de biomarcadores utilizadas para identificação das respostas fisiológicas do treinamento físico e *overtraining*.

APÊNDICE 2. Título: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS PARA DETECTAR O *OVERTRAINING*.

Nos apêndices 3 e 4 foram realizados estudos pilotos para conhecimento preliminar das respostas metabólicas e fisiológicas ocasionadas pelo treinamento periodizado simples e contínuo aeróbio.

APÊNDICE 3. Título: PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE TREINAMENTO PERIODIZADO EM NATAÇÃO UTILIZANDO RATOS WISTAR.

APÊNDICE 4. Título: EFFECTS OF ENDURANCE MONOTONOUS TRAINING IN RATS SUBMITTED TO SWIMMING EXERCISE.

Os efeitos da periodização linear e periodização em blocos incluindo todos os biomarcadores de treinamento estão apresentados nos apêndices 5 e 6 respectivamente.

APÊNDICE 5. Título: EFFECTS OF LINEAR PERIODIZATION TRAINING ON GLYCOGEN STORES, BIOMARKERS AND PERFORMANCE OF RATS.

APÊNDICE 6. Título: RESPOSTAS DE BIOMARCADORES DURANTE PERIODIZAÇÃO DO TREINAMENTO EM BLOCOS EM RATOS WISTAR.

Os efeitos do treinamento monótono abaixo da intensidade de lactato mínimo (80 e 90% do lactato mínimo) e do treinamento anaeróbio intermitente estão apresentados nos apêndices 7 e 8.

APÊNDICE 7. Título: PERFORMANCE AND BIOMARKERS ADAPTATIONS DURING SWIMMING TRAINING BELOW THE ANAEROBIC THRESHOLD.

APÊNDICE 8. Título: PHYSIOLOGICAL ADAPTATIONS IN RATS SUBMITTED AN ANAEROBIC INTERMITTENT TRAINING.

7. DISCUSSÃO

Devido à semelhança fisiológico-metabólica em ratos em comparação com humanos, a fisiologia experimental vem utilizando diferentes intervenções clínicas a níveis: patológico, nutricional, farmacológico e genético (GALDINO et al., 2003; GARCIA et al., 2003). A extrapolação de experimentações laboratoriais para aplicações em seres humanos está intimamente associada ao sucesso e comprovação científica da pesquisa realizada.

A partir da caracterização de variadas respostas fisiológicas frente a situações de estresse físico em ratos (Frequência Cardíaca, Glicemia, Lactacidemia, Enzimas, Tecidos entre outros), a aplicação do exercício tem evoluído no sentido da: avaliação individualizada da capacidade aeróbia e anaeróbia, identificação do *overtraining* e respostas ao treinamento (deARAUJO et al., 2007; HOHL et al., 2009). Assim, a intenção da fisiologia do exercício experimental é desenvolver ferramentas cada vez mais eficazes para aplicação no âmbito clínico e atualmente no esporte de alto rendimento. Em níveis clínicos, muitos estudos aplicam o treinamento em ratos considerando essa intervenção benéfica quando associada ao combate de doenças, dietas, medicamentos, técnicas laboratoriais e etc. No entanto, assim como em humanos, diferentes tipos de treinamento físico levam a distintas adaptações fisiológicas (COSTILL et al., 1991; BRAGA et al., 2001; GOBATTO et al., 2001) evidenciando que se o treinamento não for bem elaborado, respostas negativas a nível enzimático, tecidual e sistêmico podem influenciar inclusive em intervenções clínicas. Na fisiologia experimental, por mais que o foco do estudo não seja o modelo de treinamento, não se podem negligenciar os efeitos do exercício crônico nas adaptações orgânicas.

Os resultados da presente tese comprovam que as aplicações de diferentes tipos de treinamento em ratos provocam distintas respostas nos biomarcadores de *overtraining* e nas performances aeróbia e anaeróbia. A realização desse estudo surgiu após constatações de que existem acentuadas quedas na capacidade aeróbia e anaeróbia em ratos sedentários ao longo dos períodos experimentais bem como em animais treinados. A partir disso, surgiu a idéia de aplicar o maior número de treinamentos possíveis em ratos para caracterização do comportamento fisiológico em cada programa bem como verificar qual modelo de treinamento promove melhores respostas na *performance* aeróbia e anaeróbia.

Em relação ao treinamento periodizado linear em ratos, o objetivo foi utilizar um método comumente aplicado em seres humanos para estudar precisamente o comportamento das respostas fisiológicas ao longo do macrociclo (MATVEEV, 1997). A divisão do macrociclo em 3 períodos com oscilações entre volume e intensidade (Básico, Específico e

Polimento), foram sensíveis para esses animais uma vez que o tempo de treinamento em cada série foi próximo ao estimado (Apêndice 3 e Apêndice 5).

O polimento é o período de treinamento na qual a carga é reduzida com a finalidade de supercompensar os substratos energéticos previamente estimulados/depletados nos períodos básico e específico, proporcionando recuperação fisiológica e promovendo o rendimento no momento desejado (MUJIKÁ e PADILA, 2003; PAPOTI et al., 2007). Assim, o treinamento periodizado linear foi eficiente em melhorar a *performance* anaeróbia enquanto que para a *performance* aeróbia se mostrou responsável em atenuar a acentuada queda da capacidade aeróbia como mostrada no grupo controle.

Ao término do período básico de treinamento foi esperado que a capacidade aeróbia aumentasse devido ao elevado volume das séries de treinamento impostas, mas reduziu no mesmo período no qual os animais apresentaram maiores indícios de estresse fisiológico (concentração de Corticosterona e Lactato Desidrogenase aumentada). Pôde-se observar que o conteúdo de glicogênio hepático teve uma depleção proeminente ao término do período preparatório básico no qual conteve as séries com maior volume de treinamento (END-1 e END-2) o que explica em partes a elevada concentração de Lactato Desidrogenase ao final desse período. Por outro lado, a concentração de glicogênio do músculo sóleo apresentou significativo aumento ao término do período básico. Provavelmente, as séries de treinamento com alto volume estimularam uma musculatura esquelética com características oxidativas (Fibras Tipo I, Enzimas Oxidativas, Mitocôndrias) promovendo supercompensação após 24 horas de repouso antes da análise. A periodização do treinamento em ratos foi eficaz em evitar grandes alterações nos biomarcadores de *overtraining*, mas pôde-se notar que as principais adaptações de estresse ocorreram após o período de alto volume de treinamento como demonstrado principalmente pela concentração de creatina kinase, lactato desidrogenase e corticosterona após o período básico.

Em relação ao treinamento periodizado em blocos, o objetivo foi proporcionar durante 12 semanas, três picos de *performance* aeróbia e anaeróbia (Verkoshanski, 1990). A obtenção de vários picos de *performance* não foi possível para a capacidade aeróbia mas foi eficiente para o índice anaeróbio (Tlim). A aplicação do polimento ao término de cada bloco de treinamento proporcionou uma recuperação muscular apresentando valores de CK menores em relação ao grupo controle. Além disso, o Bloco 3 apresentou redução da concentração da Catalase em relação aos outros períodos devido ao período de manutenção (polimento) associar-se com o período de polimento do Bloco 2 promovendo um maior período de recuperação. Atualmente, existem inúmeras formas de elaborar o período de polimento

existindo divergências literárias a respeito dos métodos a serem utilizados (MUJIKÁ e PADILA, 2003). No presente estudo, o polimento aplicado foi baseado na redução progressiva e não-linear do volume sendo necessários outros estudos com outros métodos de polimento para melhor se adequar ao modelo animal. Além disso, as principais adaptações no conteúdo de glicogênio ocorreram após o bloco 1 o qual os períodos básico, específico e polimento tiveram maior duração.

Os treinamentos contínuos aeróbios nas intensidades equivalentes a 100, 90 e 80% do Limiar Anaeróbio foram aplicados com a finalidade de conhecer os efeitos de um treinamento monótono na fisiologia experimental uma vez que inúmeras pesquisas utilizam treinamentos contínuos sem controle do volume/intensidade/recuperação (BRAGA et al., 2001; GOBATTO et al., 2001). Os resultados do treinamento contínuo mostraram que a *performance* anaeróbia não melhorou devido a especificidade do sistema energético requisitado para execução de séries com elevado volume. No entanto, a capacidade aeróbia também não apresentou valores superiores em relação ao grupo controle ao final do treinamento. O treinamento monótono não se mostrou capaz em estimular ganhos na capacidade aeróbia uma vez que a sobrecarga imposta foi sempre constante não respeitando o princípio da progressividade do treinamento. O treinamento contínuo aeróbio apresentou um prazo para que adaptações positivas ocorressem na capacidade aeróbia (4 semanas para o grupo 90%) mostrando que um período de 12 semanas para ratos pode ser excessivo não ocasionando melhoras fisiológicas nesse modelo além de estimular um longo período de inatividade na gaiola. No entanto, os resultados mais surpreendentes giram em torno do aumento do conteúdo de glicogênio muscular após 12 semanas de treinamento monótono (100, 90 e 80% do limiar anaeróbio) o qual não pareceu ser suficientemente utilizado/clivado para melhoramento da *performance* aeróbia e anaeróbia e do volume de treinamento.

O alto volume de treinamento com cargas constantes aumentou os valores de CK nos grupos 100, 90 e 80% do limiar anaeróbio mostrando um dano muscular além dos encontrados nos treinamentos periodizado. Além disso, a concentração dos grupamentos sulfidrila durante os treinamentos contínuos a 80 e 90% do limiar anaeróbio mostrou um ataque oxidativo acima dos encontrados no grupo controle. No entanto, esse ataque oxidativo não foi suficiente para promover modificações nas linhas endógenas de defesa antioxidante como no caso das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Por outro lado, a concentração de corticosterona foi aumentada principalmente após 12 semanas no grupo 90% contínuo. Essas alterações nesses biomarcadores supra-citados mesmo não caracterizando um estado de overtraining ou overreaching devido a falta de variáveis

unânicos, mostram que treinamentos com elevado volume são mais propícios a adaptações negativas em ratos.

O protocolo de treinamento anaeróbio intermitente foi um dos resultados mais interessantes devido ao desenvolvimento da capacidade aeróbia após 12 semanas em relação ao grupo controle. Assim como em outros estudos com humanos, o treinamento de força proporcionou ganhos aeróbios devido à capacidade de sinalização múltipla celular promovendo maior tolerância a fadiga nas fibras Tipo I bem como estimulando a vasodilatação muscular e conseqüentemente a potência aeróbia (KNUTTGEN, 2007; HARAN et al., 2008). Por outro lado, o índice anaeróbio nesse grupo não se alterou após as semanas 6 e 12 com a avaliação do Tempo Limite. A avaliação da capacidade anaeróbia não foi específica de acordo com os movimentos de saltos realizados durante o treinamento intermitente uma vez que foi solicitado no teste a execução do tempo de exaustão em intensidades que proporcionam nado contínuo.

Em todos os programas de treinamento as concentrações de creatinina, uréia e ácido úrico não apresentaram valores acima dos grupos controle indicando poucas adaptações nesses biomarcadores após os períodos de treinamento.

A aplicação do teste de lactato mínimo para identificação da *performance* aeróbia e anaeróbia teve como objetivo controlar e prescrever individualmente as intensidades de treinamento baseadas no limiar anaeróbio (MAGLISHO, 1999). A padronização do teste de lactato mínimo em ratos possibilitou identificar o melhor protocolo de indução da hiperlactacidemia (Protocolo 4, 91% de sucesso) bem como utilizar um método de pura natação para a avaliação do índice anaeróbio (Tlim a 13% do PC).

Após o estudo 3 (apêndice 3), a manutenção da capacidade aeróbia determinada pelo teste de lactato mínimo alertou para a sensibilidade do teste em avaliar *performance* aeróbia (CARTER et al., 1999). No entanto, o estudo de Voltarelli et al. (2004) verificou que a capacidade aeróbia aumentou após o período de treinamento mostrando sensibilidade ao protocolo. Além disso, os elevados valores dos ajustes do polinômio de ordem 2 (R^2) para determinação do lactato mínimo bem como o aumento do número de animais que realizaram o teste em todos os grupos treinados, mostrou a eficácia do método em determinar a capacidade aeróbia.

8. CONCLUSÕES

De acordo com a presente tese pode-se concluir que:

- O teste de lactato mínimo é um protocolo que possibilita avaliar as performances aeróbia e anaeróbia ao longo dos diferentes modelos de treinamento e prescrever as intensidades individualizadas do treinamento em ratos baseado no limiar anaeróbio;
- A capacidade aeróbia e anaeróbia ao longo da vida de ratos sedentários reduzem significativamente;
- A supercompensação dos substratos energéticos (Glicogênio Muscular e Hepático) bem como a manutenção da capacidade aeróbia e aumento do tempo de exaustão ao final do período do polimento reflete a sensibilidade do treinamento aos estímulos aplicados e o sucesso na obtenção do pico de *performance* em um modelo experimental de treinamento periodizado linear e blocos;
- A periodização do treinamento em blocos e linear não apresentaram grandes alterações nos biomarcadores em relação ao grupo controle mostrando a eficiência da periodização em prevenir o *overtraining*;
- O treinamento monótono a 100% do limiar anaeróbio o volume de treinamento, aumentou os níveis plasmáticos de CK, manteve a capacidade aeróbia e aumentou as concentrações de glicogênio muscular e hepático;
- A supercompensação dos conteúdos de glicogênio após o treinamento monótono a 80 e 90% do limiar anaeróbio não foram suficientes para aumentar as *performances* aeróbia e anaeróbia;
- O treinamento anaeróbio intermitente aumentou a capacidade aeróbia, manteve a *performance* anaeróbia e não resultou em grandes variações nos biomarcadores.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase. In: PACKER, L. (Ed.). *Methods in enzymology*. Orlando: Academic, p.121-26, 1984.
- AITKEN, D. Periodization of the Kayak program. *Canoe Coach*. 15:25-28, 1994.
- ARMSTRONG, R. B. Mechanics of exercise induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 16:529-538, 1984.
- BILLAT, V.L.; SIRVENT, P.P.Y.G.; KORALSZTEIN, J.P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Medicine*. v. 33, p. 407-26, 2003.
- BOMPA, T.O. *Periodização: Teoria e Metodologia do Treinamento*. Phorte Editora, São Paulo, 1999.
- BONEN, A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *European Journal Applied Physiology*. v. 86, p. 6-11, 2001.
- BRAGA, L.R.; MELLO, M.A.; GOBATTO, C.A. Ganho de Peso e Gordura Corporal de Ratos Submetidos ao Treinamento Contínuo e Intermitente. *Motriz*, v.7, S209, 2001.
- COSTILL, D. L.; THOMAS, R.; ROBERGS, R.A.; PASCOE, D.; LAMBERT, C.; BARR, S.; FINK, W. J. Adaptations to swimming training: influence of training volume. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 23, p. 371-377, 1991.
- DANTAS, E.H. *A prática da Preparação Física*. Shape editora, Rio de Janeiro, 1998.
- DAWSON – SAUNDERS B., TRAPP R. G. *Basic & Clinical Biostatistics*. Lange Editora, Norwalk, Connecticut, 2ª edição, 1994.
- De La Rosa, A. F., *Treinamento Desportivo: Carga, Estrutura e Planejamento*. Phorte Editora, São Paulo, 2001.
- deARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F..B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comparative Biochemistry Physiology A Molecular Integrative Physiology*, v. 148(4), p. 888-92, 2007.
- FAURE, P.; LAFOND, J.L. Measurement of plasma sulphydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER, A.E. et alii. (Eds.). *Analysis of free radicals in biological systems*. Basel: Birkhäuser Verlag, p.237-48, 1995.
- FISKE, C. H.; AND SUBBAROW, Y. *Journal Biology. Chemistry* v. 66, 1925.

- FLETCHER, W.M.; HOPKINS, F.G. Lactic acid in amphibian muscle. *Journal Physiology*. v.35, p.247-309, 1907.
- FLYNN, M.G.; PIZZA, F.X.; BOONE, J.R.B.J.; ABDRES, F.F.; MICHAUD, T.A.; RODRIGUES-ZAYAS, J.R. Indices of training Stress During Competitive Running and Swimming Seasons. *International Journal Sports Medicine*, v. 15, p. 21-26, 1994.
- FOSTER, C. Monitoring training in athletes with reference to overtraining syndrome. *Medicine and Science Sports Exercise*. v.30, p.1164-8, 1998.
- FRY, R.W.; MORTON, A.R.; GARCIA-WEBB, P.; CRAWFORD, G.P.M.; KEAST, D. Biological responses to overload training in endurance sports. *European Journal Applied Physiology*, v. 64, p.335-344, 1992.
- GALDINO, R.; PIMENTA, M. H. C.; HOFLING FILHO, J. C.; FARIA, M. C.; AZEVEDO, J. R. M. Perfil lipídico de ratos suplementados com creatina. *Motriz*, v.9, 2003.
- GARCIA, D. R.; MOREIRA, C. R.; AZEVEDO, J. R. M. Os Efeitos do Treinamento Anaeróbico em Ratos Wistar Suplementados com Creatina. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, p.210, 2003.
- GLADDEN, L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *Journal Physiology*, v. 1, p. 5-30.
- GOBATTO ET AL. Efeitos da desnutrição protéico-calórica e do treinamento físico na produção de ácido láctico em ratos machos adultos após teste de cargas progressivas. Resultados preliminares. *Ciência e Cultura*, v. 43, 725-726, 1991.
- GOBATTO ET AL. Avaliações fisiológicas adaptadas à roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v. 7 p.137-147, 2008.
- GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology* , v. 130, 21-27, 2001.
- HALSON, S.L.; LANCASTER, G.I.; JEUKENDRUP, A.E.; GLEESON, M. Immunological responses to overreaching in cyclists. *Medicine and Science Sports Exercise*, v.35, p. 854-61, 2003.
- HALSON, S.L.; JEUKENDRUP, A.E. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Medicine*, v.34, p.967-81, 2004.
- HECK, H. et al. Justification of the 4 mmol/l lactate threshold. *International Journal of Sports Medicine*, New York, v. 6, p.117-130, 1985.
- HILL, A. V.; KUPALOV, P. *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B., 106, 313, 1929.

- HOHL R, FERRARESSO RL, DE OLIVEIRA RB, LUCCO R, BRENZIKOFER R, DE MACEDO DV. Development and characterization of an overtraining animal model. *Medicine and Science Sports Exercise*, v.41, p.1155-63, 2009.
- HOLLOSZY, J.O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *Journal Biology Chemistry*, v.10;242(9), p.2278-82, 1967.
- HOOPER, S. L.; MACKINNON, L. T.; HOWARD, A. Physiological and psychometric variables for monitoring recovery during tapering for major competition. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 31, p. 1205-1210, 1999.
- HOOPER, S. L.; MACKINNON, L.T.; HOWARD. A.; GORDON, D. R.; BACHMANN, A.W. Markes for monitoring overtraining and recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.27, p.106-112, 1995.
- JANSSEN, E., KUIPERS, H., KEIZER, H. Plasma CPK and AST activity an plasma testosterone after 200 KM speedskating. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. v.18, p. 42, 1986.
- KANTER, M. M., LESMES, G. R., KAMINSKY, L. A., HAM-SAEGER, J. L., NEQUIN, N. D., Serum creatine Kinase and lactate dehydrogenase cahnges following an eighty kilometer race. *European Journal Applied Physiology*. 57:60-63, 1988.
- KIRWAN, J. P., COSTILL, D. L., FYNN, M. G., MITCHELL, J. B., FINK, W. J., NEUFER, P. D., HOUMARD, J. A. Pysiological rponses to successive days of intense training in competitive swmmers. *Medicine and Science in Sports and Exercice*, v.20, p.255-259, 1988.
- KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.30(7), p.1137-9, 1998.
- LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-UŚCİLKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. *Comparataive Biochemistry Physiology A*, v.114(1), 51-5, 1996.
- LEHMANN M, GASTMANN U, PETERSEN KG, BACHL N, SEIDEL A, KHALAF AN, FISCHER S, KEUL J. Training-overtraining: performance, and hormone levels, after a defined increase in training volume versus intensity in experienced middle- and long-distance runners. *Brazilian Journal Sports Medicine*, v. 26(4), p.233-42, 1992.
- MACKINNON, L.T. Immunity in athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 18(Suppl. 1), S62-S68, 1997.
- MADER, A.; HECK, H. A theory of the metabolic origin of "anaerobic threshold". *International Journal of Sports Medicine*, v.7, p.45-65, 1986.

- MAGLISCHO, E. W. The Application of Energy Metabolism to Swimming Training. In: *Swimming and Science V*. Champaign, IL: Human Kinetics, p.209-218, 1988.
- MAGLISHO, E. W. *Nadando Ainda Mais Rápido*. São Paulo: Manole, 1999.
- MANSO, J. M.; VALDIVIELSO, M. N.; CABALLERO, J. A. R. *Planificación del Entrenamiento Deportivo*. Gymnos Editorial. 1996.
- MARANGON, L.; ZAGATTO, A. M.; PAPOTI, M.; MELLO, M. A. R.; GOBATTO, C. A. Utilização do modelo hiperbólico para a determinação da carga crítica em ratos submetidos à natação. *Motriz*, v. 9, S42, 2003.
- MARTIN, D. E., C.O.E, P. N. Developing running with periodization of training. In: MARTIN D. E., COE, P. N., eds. *Better training for distance runners*. 2nd ed. Champaign, IL: Human Kinetics, 167-252, 1997.
- MATVEEV, L. P. *Preparação Desportiva*. Londrina: Centro de Informações Desportivas, 1996.
- MATVEEV, L. P. *Treino Desportivo: Metodologia e Planejamento*. Phorte Editora, São Paulo, 1997.
- MUJIKA, I.; BUSO T.; LACOSTRE, L.; BARALE, F.; GEYSSANT, A.; CHARAD, J. Modeled responses to training and taper in competitive swimmers. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. v.28, p.251-258, 1996a.
- MUJIKA, I., CHATARD, C. J., PADILHA, S., GUEZENEC, C. Y., GEYSSANT, A. Hormonal responses to training and its tapering off in competitive swimmers: relationships with performance. *European Journal of Applied Physiology*, v.74, p.361-366, 1996b.
- MUJIKA, I., CHATARD, J. C., BUSO, T., GEYSSANT, A., BARALE, F., LACOSTE, L. Effects of Training on Performance in Competitive Swimming. *Canadian Journal Applied Physiology*, v. 20, p.395-406, 1995.
- NOGUEIRA, D. M., STRUFALDI, B., HIRATA, M. H., ABDALLA, D. S. P., HIRATA, R. D. C. *Métodos de Bioquímica Clínica: Técnica e Interpretação*. ed.Pancast. 327-331, 1990.
- PILIS W, ZARZECZNY R, LANGFORT J, KACIUBA-UŚCIŁKO H, NAZAR K, WOJTYNA J. Anaerobic threshold in rats. *Comparative Biochemistry Physiology A*, v.106(2), p.285-9, 1993.
- POLIQUIN, C. Applied strength training: part 1: short term periodisation. *Sports Coach*, v.15, p.25-28, 1992.
- PRADA, F. F. A., GOBATTO, C. A., MACEDO, D. V., MELLO, M. A. R. Indicadores de Estresse Oxidativo em Ratos Submetidos ao Treinamento por Corrida em Esteira Rolante em

Velocidade Equivalente à Máxima Fase Estável de Lactato. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. p.240, 2003.

PRADA, F. J. A.; VOLTARELLI, F. A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M. A. R. Indicadores de estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento em natação. *Espaço: Rev. Port. Ci. Desporto*, .4:237-274, 2004.

PROSKE, U.; MORGAN, D. L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol*. 537(Pt 2):333-45, 2001.

Pyne DB, Lee H, Swanwick KM. Monitoring the lactate threshold in world-ranked swimmers. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(2):291-7.

QUINDRY, J. C.; STONE, W. L.; KING, J.; BROEDER, C. E. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc*. .35:1139-1145, 2003.

RADÁK, Z.; APOR, P.; PUCSOK, J.; BERKES, I.; OGONOVSKY, H.; PAVLIK, G.; NAKAMOTO, H.; GOTOS, S. Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci*. 72:1627-33, 2003.

ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Efeitos do Treinamento Físico de Alta Intensidade sobre os Leucócitos Circulantes em Ratos. *Motriz*, v. 7, S172, 2001.

ROGATTO, G. P.; GOMES, R. J.; LUCIANO, E. Efeitos Agudos e Crônicos do Exercício Físico Intenso Sobre a Excreção Urinária de Ácido Vanilmandélico em Ratos Wistar. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. p.238, 2003.

ROWBOTTOM, D. G. Periodização do treinamento. In: GARRET Jr, W. E., KIRKENDALL, D. T. *A ciência do exercício e dos esportes*. ed.Artmed. 531, 2003.

SANTOS, J. W.; MELLO, M. A. R. Efeito do Treinamento contínuo e intervalado de natação na adiposidade corporal de ratos. *Anais do 9º Congresso de Educação Física e Ciências do Desporto dos Países de Língua Portuguesa*. São Luiz, Maranhão. p.208, Jul-ago de 2002.

SILVA, M. P.; MARCONDES, M. C. C. G.; MELLO, M. A. R. Exercícios aeróbio e anaeróbio: Efeitos sobre a gordura sérica e tecidual de ratos alimentados com dietas hiperlipídicas. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde*. 4:3, 43-56, 1999.

SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L.; THORNE, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, New York, v.175, p.408-13, 1988.

SNYDER, A.C.; KUIPERS, H.; CHENG, B. et al. Overtraining following intensified training with normal muscle glycogen. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Hagerstown, v.27, no. 7, p.1063-1070, 1995.

- SOUZA JR, T.; OLIVEIRA, P. R.; PEREIRA, B. Exercício e estresse oxidativo. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Rev Bras Med Esporte* 11:91-96, 2005.
- STONE, M. H. Musclic conditioning and musclic injuries. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. v.22, p. 457-462, 1990.
- TANAKA, H.; COSTILL, D. L.; THOMAS, R.; FINK, W. J.; WIDRICK J. J. Dray-land resistance training for competitive swimming. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 25:952-959, 1993.
- TEGTBUR, U.; BUSSE, M. W.; BRAUMANN, K. M. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. v.25, 5, 620-627, 1993.
- THOMAS, C.; PERREY, S.; LAMBERT, K.; HUGON, G.; MORNET, D.; MERCIER, J. Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. *Journal Applied Physiology*, v. 98, p. 804–809, 2005.
- TOTON, C. R.; MELLO, M. A. R.; DIAS, T. F.; ANARUMA, C. A. Teor Protéico da Dieta e Crescimento Muscular em Ratos Submetidos ao Treinamento Anaeróbio. *Motriz*, v. 7:2, p. 69-74, 2001.
- TOWN, M.H.; GEHM, S.; HAMMER, B. A sensitive colorimetric method for the enzymatic determination of uric acid. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biology*, v.23, n.9, p.591, 1985.
- VERKHOSHANSKY, Y.V. *Entrenamiento Deportivo - Planificación y programación*. Barcelona, Ed. Martinez Roca, 1990.
- VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 35, p. 1-6. 2002.
- WADA, S.; MIYANISHI, M.; KASAHARA, M.; FURONAKA, H.; ITO, M. Influence of exercise and confinement on the activity of succinic dehydrogenase of cardiac muscle. *Hiroshima Journal Medicine Science*, v.14(2), p.71-7, 1965.
- WASSERMAN, K.; McLLORY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *American Journal of Cardiology*, St. Louis, v. 14, p. 844-852, 1964.
- WEINECK, J. *Treinamento Ideal*. Editora Manole. São Paulo, 1999.

YAMAMOTO, Y., MUTHO, Y, MIYASHITA, M. Hematological and biochemical indices during the tapering period of competitive swimmers. In: *Swimming and Science V*. Champaign, IL: Human Kinetics. 243-249, 1988.

10. APÊNDICES

10.1 APÊNDICE 1

deAraujo GG, Papoti M, Manchado Fde B, de Mello MA, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;148(4):888-92.

ABSTRACT

The lactate minimum test (LACmin) has been considered an important indicator of endurance exercise capacity and a single session protocol can predict the maximal steady state lactate (MLSS). The objective of this study was to determine the best swimming protocol to induce hyperlactatemia in order to assure the LACmin in rats (*Rattus norvegicus*), standardized to four different protocols (P) of lactate elevation. The protocols were P1: 6 min of intermittent jumping exercise in water (load of 50% of the body weight — bw); P2: two 13% bw load swimming bouts until exhaustion (tlim); P3: one tlim 13% bw load swimming bout; and P4: two 13% bw load swimming bouts (1st 30 s, 2nd to tlim), separated by a 30 s interval. The incremental phase of LACmin beginning with initial loads of 4% bw, increased in 0.5% at each 5 min. Peak lactate concentration was collected after 5, 7 and 9 min (mmol L⁻¹) and differed among the protocols P1 (15.2±0.4, 14.9±0.7, 14.8±0.6) and P2 (14.0±0.4, 14.9±0.4, 15.5±0.5) compared to P3 (5.1±0.1, 5.6±0.3, 5.6±0.3) and P4 (4.7±0.2, 6.8±0.2, 7.1±0.2). The LACmin determination success rates were 58%, 55%, 80% and 91% in P1, P2, P3 and P4 protocols, respectively. The MLSS did not differ from LACmin in any protocol. The LACmin obtained from P4 protocol showed better assurance for the MLSS identification in most of the tested rats.

Key words: Hyperlactatemia induction; Lactate minimum test; Swimming rats.

INTRODUCTION

Studies on exercise physiology have increased the use of animal models to simulate the physical stress conditions frequently observed in humans, aimed to a better understanding of the systemic, cellular and molecular alterations in response to exercise. However, it is necessary that protocols for exercising animals appropriately simulate situations to be investigated (Pilis et al., 1993; Gondim et al., 2007). Among all types of exercise, swimming and treadmill running are the most used and rats are the preferred animals, since they are small, easy to manipulate and show good response to exercise.

Swimming is often employed in exercise physiology studies involving rats, especially because it deals with an innate ability and presents lower costs in comparison to treadmill running. In addition, studies using this model revealed similarities in the adaptations to the exercise in relation to those observed in humans (Gobatto et al., 2001; Voltarelli et al., 2002; Manchado et al., 2006). Nevertheless, protocols of exercise evaluation for rats need to be developed and improved.

Among the techniques used for the development of the endurance exercise capacity, training prescription at an intensity corresponding to the maximal lactate steady state (MLSS) is one of the most adequate since it corresponds to the highest blood lactate concentration and workload that can be maintained over time without continual blood lactate accumulation (Gobatto et al., 2001; Carvalho et al., 2005; Ferreira et al., 2007). The MLSS intensity may be identified during continuous exercise by considering an exercise intensity corresponding to a concentration of approximately 4 mmol L⁻¹ of lactate for humans (Sjodin and Jacobs, 1981; Heck et al., 1985).

An example of a method usually employed for the prediction of the maximal blood lactate steady state intensity in humans is the lactate minimum test (LACmin) proposed by Tegtbur et al. (1993), which enables the determination of the aerobic and anaerobic

parameters in a single protocol. The test consists of performing an incremental exercise after hyperlactatemia induction. Therefore, the blood lactate versus exercise intensity curve during the progressive test is U-shaped. The lowest level in this curve theoretically represents the maximal exercise load in which the lactate production rate is the same as the lactate removal rate, i.e. it corresponds to the maximal lactate steady state, which is considered as the gold standard test in the aerobic capacity determination (Jones and Dousty, 1998; Beneke et al., 2000; Ribeiro et al., 2003).

For evaluations in rats, an incremental test was initially proposed in an attempt to study the rat metabolic response to a single incremental exercise bout (Pilis et al., 1993). Later, Gobatto et al. (2001), determined the maximal lactate steady state (MLSS) of sedentary rats, submitting the animals to random 6 daily efforts of continuous swimming with a duration of 20 min, supporting loads equivalent to 5, 6, 7, 8, 9 and 10% of the body weight (bw). Blood samples were collected each 5 min. The authors observed stabilization of blood lactate at 5.5 mmol L⁻¹, corresponding to loads of 5 and 6% bw. In addition, an increase on the lactate stabilization load after 9 weeks of aerobic training was observed, evidencing the potential for MLSS determination and its sensitivity to the training effects. However, the concentration value at the stabilization level was maintained at 5.5 mmol L⁻¹ lactate.

The LACmin methodology predicts MLSS that is important for exercise evaluation and prescription. Little is known regarding LACmin predicted MLSS in rats. Although, there are some studies on the subject did this the effects of different blood lactate elevation procedures were not investigated in rats yet.

The MLSS is not easily applicable because it requires many testing sessions with numerous blood sampling within the same week. Therefore, Voltarelli et al. (2002) adapted the LACmin test for the swimming model using Wistar rats and compared the values obtained with rats submitted to MLSS. For the hyperlactatemia induction, the rats jumped in the water

for 6 min supporting loads of 50% bw (30 s of jumps followed for 30 s of rest). After an 8-minute recovery interval, the rats were submitted to the incremental phase of the test. Voltarelli et al. (2002) found no significant differences in relation to the individual intensity between LACmin and MLSS and verified the potential use of the LACmin test to predict MLSS in rats. However, in this study (Voltarelli et al., 2002) the test was performed in a shallow tank (80 cm) and the rats jumped to induce hyperlactatemia. These aspects may compromise the protocol reproducibility for swimming tests in rats.

In humans, it was reported that the method of lactate elevation does not affect the intensity of the LACmin (Smith et al., 2002). However, in rats the effect of lactate elevation has not been investigated. Specifically, we tested the hypothesis that different protocols to induce hyperlactatemia may interfere on lactate kinetics during the incremental test for LACmin. In this context, the objective of the present study was to determine the best protocol to induce hyperlactatemia in order to assure the lactate minimum test (LACmin) in deep water for swimming rats, standardized from maximal lactate steady state.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (60 days old) obtained from the Sao Paulo State University animal facilities were used. Rats were maintained in collective cages (5 rats/cage), in a temperature controlled room (22 ± 1 °C), with lights on from 7:00 to 19:00 h. The animals had free access to water and food (commercial rodent chow). All experiments were preceded by 2 weeks of individual adaptation to the deep water environment consisting of 5-minute water exposure daily, 5 days a week, in cylindrical tanks (80 cm diameter \times 120 cm depth), subdivided into 4 PVC cylindrical compartments of 30 cm diameter \times 120 cm depth for individual swimming (Fig. 1) filled with water at 31 ± 1 °C. The use of tanks deeper than 100 cm with smooth surface and individual compartments makes it impossible for the animals to rest at the tank bottom, forcing them to continuous swimming.

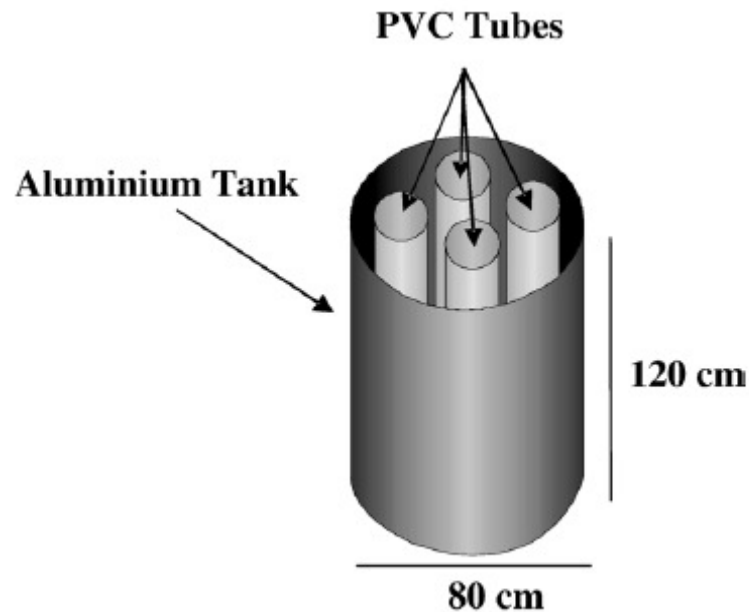


Fig. 1. Scheme of PVC tubes placed into aluminum tank for swimming rat individual exercise.

For determination of the lactate concentrations, blood samples (25 μL) were collected from rats' tail distal extremity, using of heparinized capillary tubes. Samples were transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes containing 50 μL of sodium fluoride (1%). The blood lactate was analyzed with an eletroquimical analyzer (YSI 1500 Sport).

All the experimental involving the animals followed the specific Brazilian resolutions of Bioethics of Experiments with animals (Law no. 6638, May 8th 1979, decree no. 24.645, July 10th 1934, Brazilian College of Animal Experimental).

Determination of the minimum lactate using different protocols for hyperlactatemia induction in swimming rats

For determination of the minimum lactate (LAC_{min}), 71 rats were used in 4 different hyperlactatemia induction protocols, followed by a 9-min recovery interval before incremental swimming exercise. During this interval, the animals were maintained in shallow

water to avoid thermal stress and blood samples were collected at 5, 7 and 9 min for lactate peak determination (Voltarelli et al., 2002). The incremental phase of the test was similar for all protocols and involved swimming with loads of 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, and 7.0 % of body weight (bw) for 5 min in each one. The stages were separated by 30 s for blood collection, for lactatemia determination. In all protocols (P1, P2, P3 and P4) of LACmin were obtained from derived equal zero of the second order polynomial fit (ZF) and by visual inspection (VI) for the lowest lactate value of the “U-shaped” curve of blood lactate concentration versus load of the incremental phase of the LACmin test.

The success rate in the determination of LACmin was obtained, using as criteria the presence of the fit in form of “U” and the coefficient of determination of the curve lactate versus load. Fittings of curves that disabled the second order polynomial analysis, as well as values of R2 lower than 0.8, were considered insufficient for the assurance of the method.

The different protocols for hyperlactatemia induction are described below:

- Protocol 1 (P1, n=18): consisted of 6 min exercise (30 s jump in the shallow water/30 s rest) with load of 50% bw.
- Protocol 2 (P2, n=18): consisted of two deep swim bouts to exhaustion (tlim) supporting 13% bw load, both separated by a 1 min passive rest. Exhaustion was assumed when the animal was unable to stay on the water surface for 10 s.
- Protocol 3 (P3, n=15): consisted of a single deep swim effort supporting the 13% bw load to exhaustion (tlim13%).
- Protocol 4 (P4, n=20): consisted of two deep swim efforts of 13% bw load, separated by a 30 s passive rest. The first effort lasted 30 s while the second lasted until exhaustion (tlim13%).

Maximal lactate steady state (MLSS) determination

For MLSS determination, 40 rats (10 per protocol) were submitted to 30 min of swimming performed continuously with loads equivalent to 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 and 7.0% of the bw, and blood samples (25 μ L) collection each 5 min. This procedure occurred in alternated days and the five loads were used randomly distributed among the rats. The MLSS was assumed as the highest exercise intensity in which blood lactate elevation did not exceed 1 mmol L⁻¹ between the 10th and 30th minute of exercise (Gobatto et al., 2001; Billat et al., 2003; Manchado et al., 2005).

Statistical treatment

The results are presented as mean \pm standard error of mean (S.E.M.). One-way ANOVA was used to compare the lactatemia values obtained in the 5, 7, and 9 min after acidosis induction, as well as the values of LACmin in each of the protocols investigated. This analysis was followed, when necessary, by the Newman Keuls post hoc test. The LACmin values obtained by ZF and VI analysis were compared by paired t-test. For comparison of the values of LACmin with the MLSS was paired one-way ANOVA, was used followed the Newman Keuls post hoc test, if necessary. In all statistical analysis the significant level was set at $P < 0.05$ (Dawson-Saunders and Trapp, 1994).

RESULTS

Table 1 shows the values (s) of $t_{lim13\%}$ in the different induction protocols (P2, P3 and P4). P1 was not included in Table 1 because it consists in jump protocols (4 \times 10 jumps).

Table 1. Duration (seconds) of the Tlim13% obtained in different acidosis induction protocols that involved swimming effort.

Swimming effort acidosis induction protocol			
P2	Tlim13% 89,2±5,0 (n=18)	1 min pause	Tlim13% 55,4±5,7 (n=18)
P3	Tlim13% 52,4±2,7 (n=15)		
P4	13% bw swimming load during 30s (n=20)	30s pause	Tlim13% 57,6±6,3 (n=20)

Blood lactate concentrations obtained in P1 and P2 protocols were significantly higher than those obtained in P3 and P4 protocols (Table 2). In all protocols, it was possible to determine LACmin for ZF analysis and by visual inspection (VI). By the first analysis, the coefficients of determination (R²) ranged between 0.80 and 0.99 (Fig. 2), to providing LACmin values for in 58, 55, 80 and 91% of the animals tested in P1, P2, P3 and P4, respectively.

Table 2. Blood lactate values (mmol/L) obtained at minutes 5 (Lac5min), 7 (Lac7min) and 9 (Lac9min) after maximum efforts for acidosis induction from different protocols tests.

	Lac5min	Lac7min	Lac9min
P1 (n=18)	15.2±0.44	14.86±0.67	14.75±0.63
P2 (n=18)	13.95±0.30	14.91±0.30	15.53±0.40
P3 (n=15)	5.15±0.15 *#	5.61±0.17 *#	5.64±0.33 *#
P4 (n=20)	4.66±0.17 *#	6.76±0.15 *#	7.11±0.19 *#

Significant differences (P<0.05) in relation to *P1; #P2.

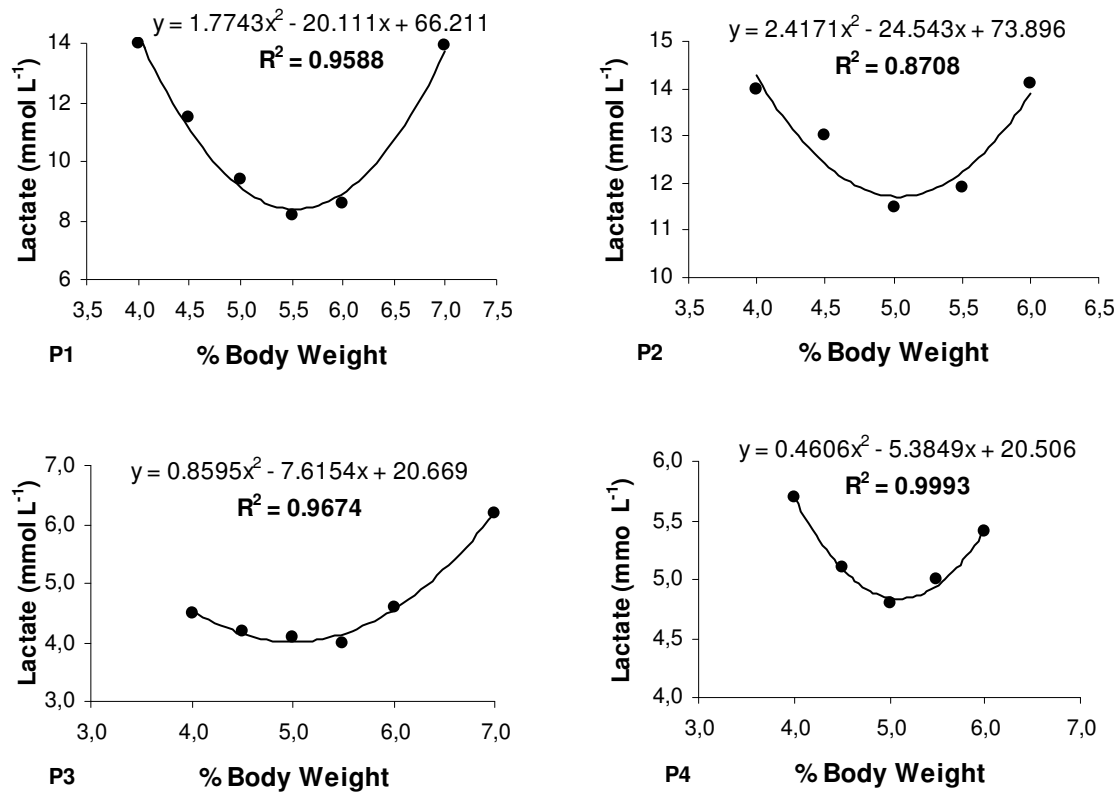


Figure 2. Examples of lactate minimum (LACmin) determination through different acidosis induction protocols in on rat for each protocol (P1, P2, P3 and P4). By the success rate criterion of LACmin determination, there was 58, 55, 80 and 91% of success in the P1, P2, P3 and P4 protocols, respectively. The mathematical polynomial equation was used for derived fit LACmin individual determination (ZF). Isolated fit curve was used to visual inspection for LACmin individual acquisition (VI).

The values of LACmin obtained through ZF or VI, independently of the protocol for lactate induction did not differ (Table 3). The blood lactate concentrations at LACmin were higher in P1 and P2 protocols than in P3 and P4 (Table 4).

Table 3. Lactate Minimum (LACmin) values determined from zero derived polynomial fit curves (ZF) and visual inspection (VI) obtained through different acidosis induction protocols tests (P1, P2, P3 and P4).

	P1 (n=18)	P2 (n=18)	P3 (n=15)	P4 (n=20)
ZF	5.18 ± 0.60	5.12 ± 1.48	5.23 ± 0.45	5.06 ± 0.93
VI	5.05 ± 0.50	5.36 ± 0.50	5.21 ± 0.42	5.17 ± 0.47

Table 4. Minimum blood lactate values (mmol/L) observed in the four LACmin acidosis protocols (P1, P2, P3 and P4), and percentage in relation to the blood lactate stabilization obtained in the maximal lactate steady state continuously exercise test.

	P1 (n=18)	P2 (n=18)	P3 (n=15)	P4 (n=20)
Minimum blood lactate values				
	11.65 ± 0.81	12.45 ± 0.56	4.57 ± 0.26*#	5.76 ± 0.47*#
% of maximal lactate steady state concentration				
	185.5 ± 12.90	198.2 ± 9.05	73.02 ± 4.48*#	91.65 ± 7.55*#

Significant differences (P<0.05) in relation to *P1; #P2.

MLSS in deep water swimming was obtained in the loads varying from 4.5% to 5.5% bw (Fig. 3), with a mean value of 5.3% bw ($\pm 0.5\%$).

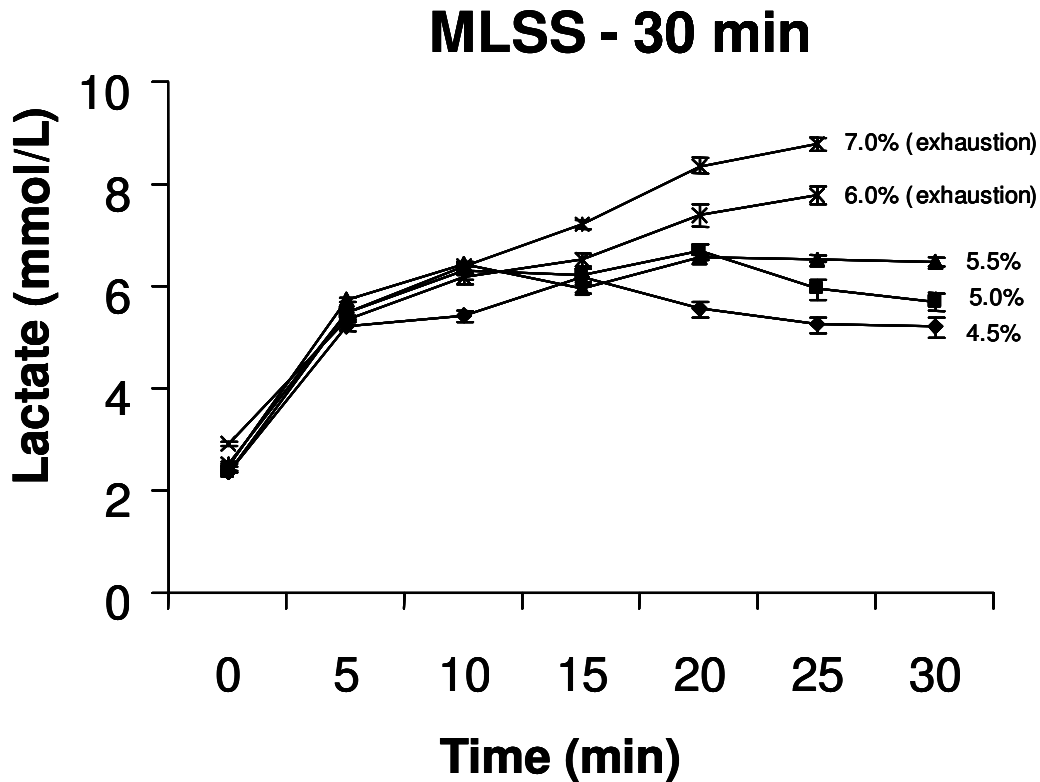


Figure 3. Maximal lactate steady state (MLSS) determination in forty sedentary rats, which were submitted to the four LACmin protocols tests. The MLSS determination used loads of 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 and 7.0% of rat body weight (bw). The MLSS was considered as the maximal load intensity that shows lactate stabilization. In this case, the MLSS was 5.5% bw at 6.2mmol/L blood lactate.

There was no significant difference ($P < 0.05$) between the MLSS load and the LACmin obtained from all protocols, independent of ZF or VI. Therefore, the blood lactate concentration at MLSS load was highest for P4 (Table 3), corresponding to 91.5% (± 7.6).

DISCUSSION

The method used for the determination of the aerobic capacity in the present study was the lactate minimum test proposed by Tegtbur et al. (1993) and adapted by Voltarelli et al. (2002) for a swimming model using Wistar rats. However, the present study used a deep tank during the incremental phases so that the rats were not able to remain at the bottom of the tank, to rest in apnea or to perform jumps. Although there were significant differences in the lactate maximum concentrations at 5, 7 and 9 min (P1 and P2 >P3 and P4), the LACmin values were not significantly different between the four protocols for the hyperlactatemia induction. These results corroborate previous results obtained for humans (Smith et al., 2002). These authors reported no significant differences in the LACmin values of cyclists submitted to different lactate induction methods, including progressive efforts until exhaustion; 30 s and 40 s maximal power pedaling efforts; and 2 bouts of 20 s of maximal power exercise separated by 1 minute passive interval in cycle ergometer.

In contrast, the LACmin determination success rate seems to be dependent on the protocols for lactate induction. Exercise intensities in P1 and P2 were higher than in P3 and P4 and induced higher blood lactate concentration after lactate elevation phase. The less satisfactory lactate kinetics during the incremental phase of the lactate minimum test can be attributed at least in part to this fact. After P1 the lactate peak resulting in a mean of 15.02 mmol L⁻¹ possibly by typical contribution of the energy systems for a high intensity of the exercise (50% bw) and duration of 6 min exercise (30 s jump in the shallow water/30 s rest). High peak blood lactate concentration was measured also after the P2 possibly due to the time swim bouts to exhaustion (tlim) supporting 13% bw load. Thus, the difficulties of removal this metabolite in sedentary rats during resting period (until 9 min) may be an important factor for adjusting lactate kinetics during incremental part of the test, diminishing the percentage of success in P1 and P2. Maybe, if the resting period between induction of hyperlactatemia and

the initial workload was altered in the incremental phase test, the incidence of LAC_{min} identification could be better (Carter et al., 1999).

Besides, the percentage of success was larger in induction protocols that promote lower lactate concentration (P3 and P4). Using P4, where the animals swam 30 s with a load of 13% of bw followed by a 30 s passive rest period and a 13% swimming exercise bout, it was possible to determine the LAC_{min} successfully in 91% of animals tested.

No significant differences were observed in the LAC_{min} determination between polynomial adjustment (ZF) and visual inspection (VI) in any of the investigated protocols. Ribeiro et al. (2003) compared LAC_{min} values of swimmers determined by visual inspection using the Spline function in stages of 200 m and 300 m in crawl swimming and did not observe significant differences in the LAC_{min}. However, Ribeiro et al. (2003) reported that the stage of 300 m seemed to provide more precise MLSS.

The maximal lactate steady state during continuous exercise was used as a control protocol to validate of LAC_{min} test. MLSS corresponds to the highest blood lactate concentration at which lactate removal capacity compensates its entry (Mader and Heck, 1986; Billat et al., 2003). Pringle and Jones (2002), consider MLSS as the “gold standard” method for the determination of the aerobic–anaerobic metabolism transition (Beneke, 1995; Beneke, 2003; Billat et al., 2003).

In the present study, the MLSS was obtained at intensity corresponding to the LAC_{min} load in all protocols analyzed. Gobatto et al. (2001) submitted 27 sedentary rats to swimming exercise supporting constant loads of 5, 6, 7, 8, 9 and 10% of body weight. The MLSS was verified at blood lactate concentrations of 5.5 mmol L⁻¹ and load equivalent to 5% bw. After physical training, the authors reported that the animals elevated the MLSS load to 8%, but the lactate concentration remained unchanged (5.5 mmol L⁻¹). Voltarelli et al. (2002), also using swimming rats, observed MLSS at a load of 4.95± 0.10% of bw, although at higher

lactate concentration ($7.17 \pm 0.16 \text{ mmol L}^{-1}$). Recently, in treadmill running, Manchado et al. (2005) verified that the MLSS occurs at 20 m/min and at lower lactate concentration in relation to the swimming exercise model ($3.9 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1}$). These differences in blood lactate concentration at stabilization and MLSS intensity between studies suggest that the blood lactate responses are protocol dependent, similar to the observations in different exercise tests for humans (Jones and Dousty, 1998; Schneider et al., 2000).

The present study shows different blood lactate concentration, depending on the protocol used for hyperlactatemia, for similar LACmin values. This indicates that even dealing with only one type of protocol (lactate minimum test) the blood lactate concentration at LACmin may be quite different.

Altogether, our results indicate P4 as the best protocol for lactate induction for swimming rats. Although the different protocols used for hyperlactatemia induction did not change the LACmin values, P4 presented the highest success rate for LACmin determination (91% of the cases) as well as the best agreement between blood lactate concentration at LACmin and MLSS intensities.

Acknowledgements. The authors thank FAPESP (04/01205-6; 04/07070-5; 06/58411-2) for the financial support.

REFERENCES

Beneke, R., 1995. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27, 863–867.

Beneke, R., 2003. Methodological aspects of maximal lactate steady state implications for performance testing. *Eur. J. Appl. Physiol.* 89, 95–99.

- Beneke, R., Hütler, M., Leithäuser, R.M., 2000. Maximal lactate steady state independent of performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 1135–1139.
- Billat, V.L., Siverent, P., Py, G., Korallsztein, J.P., Mercier, J., 2003. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Med.* 33, 407–426.
- Carter, H., Jones, A.M., Doust, J.H., 1999. Effect of incremental test protocol on the lactate minimum speed. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31, 837–845.
- Carvalho, J.F., Masuda, M.O., Pompeu, F.A.M.S., 2005. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 140, 409–413.
- Dawson-Saunders, B., Trapp, R.G., 1994. *Basic and Clinical Biostatistic*. Appleton and Lange, East Norwalk, CT.
- Ferreira, J.C., Rolim, N.P., Bartholomeu, J.B., Gobatto, C.A., Kokubun, E., Brum, P.C., 2007. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 760–765.
- Gobatto, C.A., Mello, M.A.R., Sibuya, C.Y., Azevedo, J.R.M., Santos, L.A., Kokubun, E., 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. A* 130, 21–27.
- Gondim, F.J., Zoppi, C.C., Silva, L.P., Macedo, D.V., 2007. Determination of the anaerobic threshold and maximal lactate steady state speed in equines using the lactate minimum speed protocol. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146, 375–380.
- Heck, H., Mader, A., Hess, G., Mücke, S., Müller, R., Hollmann, W., 1985. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. *Int. J. SportsMed.* 6, 117–130.
- Jones, A.M., Doust, J.H., 1998. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 km running performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30, 1304–1313.

- Mader, A., Heck, H., 1986. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. *Int. J. Sports Med.* 7, 45–65.
- Manchado, F.B., Gobatto, C.A., Contarteze, R.V.L., Papoti, M., Mello, M.A.R., 2005. Maximal lactate steady state in running rats. *J. Exerc. Physiol.* online. 8, 29–35.
- Manchado, F.B., Gobatto, C.A., Voltarelli, F.A., Mello, M.A.R., 2006. Nonexhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31, 731–736.
- Pilis, W., Zarzeczny, R., Langfort, J., Kaciuba-Uscilko, H., Nazar, K., Wojtyna, J., 1993. *Comp. Biochem. Physiol. A* 106 (2), 285–289.
- Pringle, J.S.M., Jones, A.M., 2002. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. *Eur. J. Appl. Physiol.* 88, 214–226.
- Ribeiro, L., Balikian, P., Malachias, P., Baldissera, V., 2003. Stage length, spline function and lactate minimum swimming speed. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 43, 312–318.
- Schneider, D.A., McLellan, T.M., Gass, G.C., 2000. Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercises. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 608–613.
- Sjodin, B., Jacobs, I., 1981. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. *Int. J. Sports Med.* 2, 23–26.
- Smith, M.F., Balmer, J., Coleman, D.A., Bird, S.R., Davison, R.C., 2002. Method of lactate elevation does not affect the determination of the lactate minimum. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34, 1744–1749.
- Tegtbur, U., Busse, M.W., Braumann, K.M., 1993. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25, 620–627.
- Voltarelli, F.A., Gobatto, C.A., Mello, M.A.R., 2002. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 1–6.

10.2 APÊNDICE 2

deAraujo GG, Gobatto CA, Hirata RD, Hirata MH, Cavaglieri CR, Verlengia R. RESPOSTAS FISIOLÓGICAS PARA DETECTAR O *OVERTRAINING*. Revista da Educação Física Vol. 19, No 2, 2008.

RESUMO

O exercício, quando praticado de modo intenso e sem períodos adequados de recuperação, pode desencadear o *overtraining*, o qual é caracterizado por uma série de distúrbios fisiológicos e metabólicos, associados à redução da *performance*. O *overtraining* pode ser monitorado por respostas cardiorrespiratória nas quais se observa diminuição do consumo máximo de oxigênio e da frequência cardíaca. Os biomarcadores são parâmetros hormonais, bioquímicos, imunológicos e hematológicos utilizados também para diagnosticar, tratar e prevenir o estado de *overtraining*. Embora existam muitos estudos que relacionam o *overtraining* e as respostas desses biomarcadores ao longo do treinamento, ainda não há consenso na literatura quanto ao melhor indicador fisiológico. Desse modo, o objetivo do presente estudo de revisão é relatar as principais respostas fisiológicas causadas pelo *overtraining* para que pesquisadores, treinadores e atletas aprofundem seu conhecimento sobre os meios de detectar este estado ocasionado pelo mau planejamento do treinamento.

Palavras-chave: *overtraining*; hormônios; metabólitos.

ABSTRACT

The excessive exercises allied with inadequate recovery periods cause disturbs in metabolic and physiological parameters unleashing the overtraining. The overtraining can be controlled by innumerable biomarkers that enable the real state of athlete. However, to characterize the overtraining is important that biomarkers as hormonal, biochemistry, metabolic, $VO_2 \text{ max}$ and heart variability must be associated with decline in performance. Clinical test is important to diagnostic, to prevent and to treat the overtraining. Although there are many studies on the overtraining, there are still contradictions in the literature about the best indicator. Thus, the aim of this review is to expound the main physiological responses caused by overtraining to researchers, trainers and athletes deepen their knowledge on the way of to detect overtraining caused by inadequate program of training.

Key words: Overtraining, hormones metabolites.

utilizados para se detectar a existência desse estado. Especificamente, as principais diferenças entre o *overreaching* e o *overtraining* são o tempo de tratamento necessário para a recuperação e a duração dos sintomas (ROWBOTTOM *et al.*, 1997; SNYDER, 1998; ZOPPI *et al.*, 2007).

Além da idéia principal sobre o acúmulo de esforço, o conceito de *overtraining* passou a ser direcionado também às alterações fisiológicas (BAPTISTA *et al.*, 1999; DUCLOS *et al.*, 2007). Fatores não inerentes ao treinamento físico — como balanço energético negativo, dieta inadequada, sono inadequado e distúrbios emocionais — podem prolongar ou antecipar o estado de *overtraining* (MORGAN *et al.*, 1987; FLYNN *et al.*, 1994; LOWERY & FORSYTHE, 2006). Por esse motivo, inúmeras análises clínicas passaram a ser utilizadas na ciência do esporte para aprimorar os meios de detecção do *overtraining*. Não obstante, não são evidentes os conjuntos de variáveis fisiológicas unânimes capazes de caracterizar o *overtraining* como uma síndrome. Por esse motivo, o *overtraining* pode ser considerado um estado em que se torna possível reverter e/ou prevenir tal situação.

Destarte, o objetivo deste trabalho é revisar a literatura referente às principais alterações fisiológicas geradas pelo *overtraining* entre as variáveis cardiorrespiratórias, hormonais, imunológicas, hematológicas, bem como demonstrar indicativos fisiológicos mais recentes utilizados para detectar o *overtraining*.

METODOLOGIA

Para o levantamento bibliográfico foram utilizados principalmente artigos científicos de periódicos pesquisados através de sistemas de busca das áreas de ciências biológicas e ciências da saúde. As bases de dados mais utilizadas foram encontradas na página digital da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) (<<http://www.periodicos.capes.gov.br>>). Além disso, as bibliotecas da Universidade Estadual Paulista — *Campus* Rio Claro — e da Universidade de São Paulo – São Paulo foram

consultadas e forneceram, além do acervo bibliográfico, o serviço de comutação (COMUT), o qual possibilitou a obtenção de trabalhos não encontrados pelos meios supracitados.

RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIA AO *OVERTRAINING*

O sistema nervoso autônomo é controlado basicamente pelos sistemas parassimpático e simpático, os quais influenciam diretamente as funções cardiorrespiratórias. Tem sido visto que o estado de *overtraining* altera a funcionalidade da frequência cardíaca, a qual pode ser utilizada como um indicativo de alteração parassimpático ou simpática (HYNYNEN *et al.*, 2006).

Estudos têm relatado algumas variações na *performance* de atletas em *overtraining* pela diminuição nos valores de consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{ max}}$). Em ciclistas foi verificada diminuição de 8% no $VO_{2\text{ max}}$ durante duas semanas de treinamento intenso (4,8 vs 4,4 L/min) (JEUKENDRUP *et al.*, 1992). Resultados semelhantes foram encontrados por Snyder *et al.* (1995) após 15 dias de treinamento de alta intensidade (4,9 vs 4,7 L/min). Essas alterações indicam efeitos negativos do *overtraining* sobre essa variável de *performance*, uma vez que, com o treinamento controlado, são esperados aumentos no $VO_{2\text{ max}}$ (ZAVORSKY, 2000). Não obstante, as reduções no $VO_{2\text{ max}}$ não estão diretamente relacionadas ao sistema de controle autônomo como a frequência cardíaca. Isso se deve a outros fatores periféricos que podem influenciar na redução do $VO_{2\text{ max}}$, como a redução dos estoques de energia, diminuição da atividade de enzimas oxidativas, capilarização reduzida, aumento da mioglobina plasmática e outros (Cunha *et al.*, 2006).

Em relação à frequência cardíaca, Lehmann *et al.* (1991) e Urhausen *et al.* (1998) demonstraram redução após um período de treinamento intenso. Esse efeito foi relacionado à incapacidade do atleta de atingir esforços máximos durante o estado de *overtraining* o que provoca, conseqüentemente, menor atividade cardíaca. Por outro lado, não é evidente que a queda na frequência cardíaca máxima seja conseqüência da fadiga prematura. Zavorsky

(2000) relata que a queda da frequência cardíaca máxima não deve estar considerada como indicativo de *overtraining*, já que o decréscimo desse parâmetro indica melhora do volume de ejeção, redução e densidade do número de receptores β -adrenérgicos, levando a uma adaptação cardíaca positiva ao treinamento. Por outro lado, as alterações na frequência cardíaca podem realmente diagnosticar o estado de *overtraining*, devido às alterações encontradas em períodos de treinamento mais intensos (ATLAOUI *et al.*, 2007).

Atlaoui *et al.* (2007) relataram que o *overtraining* altera a atividade do sistema nervoso autônomo, refletindo-se em variações na frequência cardíaca devido ao aumento das concentrações urinárias de adrenalina e noradrenalina, principalmente em períodos de treinamento mais intensos. Entretanto, são necessários mais estudos que analisem a frequência cardíaca durante o treinamento para identificação das mudanças ocorrentes no *overtraining*. Mesmo assim, as mensurações da frequência cardíaca podem ser um método viável para detecção do *overtraining*, por ser um método barato e de fácil aplicabilidade (ACHTEN & JEUKENDRUP, 2003).

Não obstante, é necessário cautela na avaliação dos parâmetros VO_2 max e frequência cardíaca de forma isolada, pois outras variáveis (bioquímicas, moleculares e psicológicas), assim como o período de treinamento e possíveis adaptações positivas, também influenciam na resposta ao *overtraining* (HALSON & JEUKENDRUP, 2004).

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS AO *OVERTRAINING*

Na fisiologia do exercício, análises bioquímicas com lactato, creatinaquinase, uréia, amônia e creatinina possibilitam identificar funções e respostas de componentes metabólicos celulares em sessões agudas ou mesmo após períodos prolongados de treinamento.

Lactato

O lactato é um metabólito produzido constantemente em repouso por diversos tecidos do corpo, (intestinos, fígado, hemácias e músculos) e principalmente durante o exercício predominantemente anaeróbio. Durante o esforço físico, existem inúmeras causas para o aumento da concentração do lactato, como a diminuição do consumo de oxigênio pelas células musculares (GLADDEN, 2004), glicólise acelerada devido à atividade aumentada das enzimas lactatodesidrogenase e fosfofrutoquinase, saturação nos mecanismos de bombas de prótons, aumento da fosforilase devido a maior concentração de cálcio, fosfato inorgânico e adenosina monofosfato (PAROLIN *et al.*, 1999) e vasoconstrição periférica, diminuindo a oxigenação em diversos tecidos e atenuando a ligação do H⁺ ao O₂ (NIELSEN *et al.*, 2002; SHULMAN, 2005).

A formação de lactato também está relacionada à taxa de produção energética pelo glicogênio muscular (SHULMAN, 2005). Sendo assim, o lactato sanguíneo, aliado a outros parâmetros, parece ser um bom indicador de esforço anaeróbio láctico, podendo ser utilizado ao longo do treinamento como um marcador de *overtraining* (BOSQUET *et al.*, 2001; BONIFAZI *et al.*, 2000). Lehmann *et al.* (1996) verificaram reduções significativas nas concentrações de lactato após esforço submáximo (2,9 vs 2,4 mmol/L) e após esforços máximos (11,3 vs 9,5 mmol/L) em indivíduos com *overtraining*. Bosquet *et al.* (2001) mostraram que indivíduos com *overtraining* e *overreaching* apresentaram reduções nas concentrações de lactato em teste incremental quando comparados a indivíduos-controle. Segundo Brooks *et al.*, baixas concentrações de lactato durante o exercício podem ser explicadas pela incapacidade produtora da musculatura ou pelo aumento de sua utilização no músculo e em outros órgãos. Por outro lado, Bonifazi *et al.* (2000) relataram que a produção de lactato em nadadores pode ser um bom indicador de aumento de energia anaeróbia no

período de polimento, estando relacionada à melhora dos estoques intramusculares de glicogênio e à capacidade de transporte desse metabólito para a corrente sanguínea.

Muitos mecanismos estão envolvidos na redução do lactato sanguíneo em indivíduos com *overtraining*. Snyder *et al.* (1995) mostraram que diminuições na concentração de lactato podem ocorrer em indivíduos com *overtraining* mesmo com os estoques de glicogênio em condições normais; no entanto, Costill *et al.* (1988) verificaram que inúmeras sessões intensas de treinamento provocaram deficiências na ressíntese do glicogênio. Em contraste, reduções nas concentrações de lactato após excessivos períodos de treinamento (*overreaching*) podem exercer efeitos supercompensatórios durante o período de recuperação (STEINACKER *et al.*, 2000).

As diferenças na produção de lactato em resposta ao *overtraining* podem estar relacionadas à capacidade de mobilização do substrato energético (BOSQUET *et al.*, 2001). Baron *et al.* (1985) relataram que a baixa produção de lactato juntamente com a hipoglicemia durante o exercício (independentemente dos estoques de glicogênio) demonstra que alterações no hormônio do crescimento e cortisol em indivíduos em *overtraining* são responsáveis por esse efeito.

Embora a redução do lactato sanguíneo seja um bom parâmetro para diagnosticar o *overtraining*, esse efeito pode ser decorrente de uma adaptação orgânica positiva em diminuir sua capacidade produtora para uma mesma intensidade de esforço (HALSON & JEUKENDRUP, 2004). Desse modo, a concentração de lactato isolada não pode ser usada como um marcador específico de *overtraining*, sendo importante analisar a atividade de algumas enzimas do metabolismo glicolítico, como Glicogênio Sintase Quinase 3 (GSK3), Glicogênio Sintase (GS), lactato desidrogenase (LD), fosfofrutoquinase (PFK) entre outras.

Creatina Quinase (CK)

A CK é uma enzima amplamente utilizada como biomarcador de estresse e alteração na atividade muscular. A elevação sérica da CK é atribuída a danos teciduais, podendo resultar em aumento da permeabilidade da membrana celular, entre outras conseqüências, devido à peroxidação lipídica (ZOPPI *et al.*, 2003).

Tem sido verificado que as concentrações de CK se alteram em resposta a mudanças no volume e intensidade de treinamento (YAMAMOTO *et al.*, 1988; FLYNN *et al.*, 1994); no entanto, o período de polimento é a principal fase do treinamento e aquela na qual há melhor recuperação muscular, promovendo diminuições na CK sérica (MUJIKI *et al.*, 2004). Bruunsgaard *et al.* (1997) analisaram o efeito da contração excêntrica e concêntrica sobre as concentrações de catecolaminas, citocinas e de CK. Embora as concentrações de catecolaminas não tenham apresentado diferenças, as concentrações de CK aumentaram significativamente 4 dias após a atividade excêntrica. Por outro lado, é interessante destacar que os valores de CK sofrem alterações conforme o período de análise após o exercício. Totsuka *et al.* (2002) verificaram que o pico de liberação da CK sérica ocorreu 48 horas após exercício intenso e que 24 horas de repouso não foram suficientes para manifestação do efeito agudo do exercício. Milias *et al.* (2005) verificaram, em humanos, que os valores máximos de CK foram obtidos 96 horas após a realização de exercício resistido. Embora ainda existam controvérsias na literatura quanto à aplicabilidade dessa enzima como ferramenta efetiva na identificação do estado de *overtraining*, a CK parece ser sensível às alterações de volume do treinamento (KIRWAN *et al.*, 1988; COSTILL *et al.*, 1991; FLYNN *et al.*, 1994).

Uréia

A uréia é um composto orgânico formado pelo metabolismo final protéico e pode indicar indiretamente a decomposição celular e das proteínas do organismo. Considerando-se que indivíduos em *overtraining* apresentam alto catabolismo proteico, conseqüentemente a formação de uréia deve ser aumentada. Contraditoriamente, algumas pesquisas com atletas em

overtraining não revelaram nenhuma alteração nas concentrações desse metabólito (LEHMANN *et al.*, 1991; LEHMANN *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2006), embora pareça existir uma relação discreta entre o elevado volume de treinamento e o aumento da uremia (HALSON *et al.*, 2003).

Amônia

O aumento da amônia no organismo indica alta atividade do ciclo da uréia. No fígado a amônia produzida é convertida em uréia, podendo indicar indiretamente qualquer alteração no metabolismo protéico. Mesmo assim, são poucos os estudos que verificaram alterações nesse composto em atletas em *overtraining* (SILVA *et al.*, 2006; HALSON *et al.*, 2003).

Creatinina

A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina que é produzida constantemente pelo organismo. A creatinina é um marcador útil de função glomerular renal. Ainda não se sabe certamente qual a sua relação com o *overtraining*, parecendo não existir nenhuma variação com o volume e intensidade de treinamento (LEHMANN *et al.*, 1991).

RESPOSTAS HORMONAIAS AO OVERTRAINING

Testosterona e Cortisol

A testosterona possui tanto ação anabólica quanto androgênica, dependendo do tecido de ação. No músculo esquelético, a testosterona atua como hormônio anabólico, aumentando a síntese protéica. A mensuração das concentrações plasmáticas de testosterona livre vem sendo muito utilizada entre pesquisadores que buscam identificar algumas respostas fisiológicas do treinamento (MACKINNON *et al.*, 1997), porém esses resultados ainda são contraditórios. Flynn *et al.* (1994) observaram um decréscimo nas concentrações de testosterona livre coincidentemente com diminuição da *performance* durante o *overtraining*.

Urhausen *et al.* (1998) verificaram em indivíduos em *overtraining* significativa diminuição da *performance* em atletas de *endurance* e concentrações de testosterona normais.

Diferentemente, o cortisol apresenta uma ação catabólica, prevenindo a reesterificação de ácidos graxos e induzindo a lipólise. Urhausen *et al.* (1998) relataram que indivíduos em *overtraining* têm cortisol sérico aumentado em relação a indivíduos com atividade física normal (264 ± 28 vs 254 ± 19 nmol/L). Entretanto, nem sempre são observados aumentos nas concentrações séricas desse hormônio durante o período de *overtraining* (HOOPER *et al.*, 1993; MACKINNON *et al.*, 1997; HALSON & JEUKENDRUP, 2004).

Considerando-se o efeito antagonista desses hormônios, a relação testosterona/cortisol (T/C) tem sido empregada no monitoramento do treinamento físico, podendo indicar o nível de estresse imposto pela fase do treinamento. Quando a razão T/C é aumentada, ou seja, a concentração de testosterona é maior que a concentração de cortisol, isso indica um resultado positivo em relação ao treinamento; já o decréscimo sugere que o método de treinamento utilizado representa um estímulo estressor intenso para o organismo.

Simões *et al.* (2004), comparando a razão T/C entre corredores fundistas e velocistas, verificaram que o treinamento de maior volume e menor intensidade apresentou maior incidência de queda na razão T/C quando comparado ao grupo de velocistas. Esses resultados sugerem que a razão T/C seja mais influenciada pelo volume do que pela intensidade dos treinamentos.

Sendo um dos principais indicativos do estado de treinamento, a razão T/C pode indicar um balanço entre anabolismo e catabolismo, diferentemente da análise individual das concentrações séricas de testosterona e cortisol. No entanto, Mujika *et al.* (2004) descreveram que a razão T/C não se altera após o período de polimento em atletas, obtendo apenas variações nas concentrações sanguíneas isoladas de testosterona e cortisol (Figura 2).

Figura 2. Efeitos do polimento nas concentrações sanguíneas de testosterona, cortisol e razão testosterona/cortisol. *Adaptado de Mujika et al. (2004).*

ESTUDO	ATLETAS	TESTOSTERONA	CORTISOL	TESTOSTERONA/ CORTISOL
Houmard et al. (1990)	Corredores	↔	↔	↔
Costill et al. (1991)	Nadadores	↑	↓	NR
Tanaka et al. (1993)	Nadadores	↔	↔	↔
Flynn et al. (1994)	Corredores	↔	↔	↔
Mujika et al. (1996)	Nadadores	↔	↔	↔
Stone et al. (1996)	Halterofilista	↔	↔	↔
Bonifazi et al. (2000)	Nadadores	NR	↓	NR
Martin et al. (2000)	Ciclistas	NR	↑	NR
Mujika et al. (2000)	Corredores	↔	↔	↔
Steinacker et al. (2000)	Remadores	↑	↑	NR
Dressendorfer et al. (2002)	Ciclistas	↑	NR	NR
Mujika et al. (2002)	Corredores	↑	↔	↔

NR= Não Relatado; ↓ indica diminuição; ↑ indica aumento; ↔ indica estagnação.

Em atletas em *overtraining*, um decréscimo na razão T/C de aproximadamente 30% é considerado um valor relevante como indicativo de uma resposta estressante ao treinamento (BANFI & DOLCI, 2006). Banfi *et al.* (1993) mostraram que indivíduos em *overtraining* apresentavam menores valores na razão T/C em comparação a patinadores velocistas que treinavam intensamente, tendo verificado que o aumento abrupto no volume de treino foi o principal fator responsável por uma diminuição nessa razão, menor que 30%. Nesse contexto,

Uchida *et al.* (2004) mostraram que o treinamento de força após oito semanas em mulheres jovens aumentou a razão T/C na situação de repouso, sugerindo a ocorrência de uma adaptação positiva às cargas impostas.

Esses resultados demonstram que a razão T/C pode ser utilizada como uma ferramenta confiável para determinação do estado de treinamento. Além disso, a não-alteração dessa razão em atletas e as variações encontradas em atletas em *overtraining* demonstram algum padrão de resposta do parâmetro em indicar o nível anabólico e catabólico do treinamento. Mesmo assim, as análises isoladas de cortisol e testosterona não devem ser excluídas.

Sistema nervoso autônomo

Os sistemas parassimpático e simpático são responsáveis pelo controle do sistema nervoso autônomo, secretando os dois principais neurotransmissores (noradrenalina e acetilcolina). A atividade desses sistemas é alterada em situações de estresse e desequilíbrios na homeostasia (HYNENEN *et al.*, 2006). Israel (1976) verificou que podem existir dois tipos de *overtraining*: o simpático e o parassimpático. Halson & Jeukendrup (2004) descrevem que a forma parassimpática é caracterizada pelo aumento da fadiga, apatia e função alterada dos sistemas imunológico e reprodutor. A alteração parassimpática é observada com maior frequência em atletas de *endurance*, tendo seu tônus aumentado no repouso e durante o exercício (SILVA *et al.*, 2006).

A forma simpática de *overtraining* é caracterizada pelo aumento do sistema nervoso autônomo em repouso e provoca alterações básicas da funcionalidade orgânica, como aumento da frequência cardíaca basal e diminuição do volume de ejeção (ATLAOUI *et al.*, 2007). Em contraste, o sistema parassimpático aumentado em repouso indica que houve uma modulação positiva com o treinamento pela redução da frequência cardíaca de repouso e melhora do volume de ejeção (HEDELIN *et al.*, 2000).

Durante o esforço na ausência do *overtraining*, o aumento da frequência cardíaca máxima indica efeitos positivos do treinamento modulados diretamente pela ação das catecolaminas (HYNYNEN *et al.*, 2006).

O monitoramento das catecolaminas (plasma e urina) pode ser feito durante períodos de treinamento, competição e logo após o término da atividade (URHAUSEN *et al.*, 1995; ATLAOUI *et al.*, 2007).

Durante o exercício incremental, as concentrações de adrenalina e noradrenalina correlacionam-se com o aumento exponencial no lactato sanguíneo (SCHNEIDER *et al.*, 1992). Durante o exercício prolongado com intensidades abaixo do limiar anaeróbio, as catecolaminas aumentam de forma duração-dependente; no entanto, as concentrações de lactato permanecem constantes ou até mesmo se reduzem (URHAUSEN *et al.*, 1995). Se a intensidade do exercício exceder o limiar anaeróbio, a concentração das catecolaminas aumenta, sinalizando alta atividade simpato-adrenérgica. Os exercícios de curta duração e alta intensidade (anaeróbio láctico) são caracterizados por uma maior liberação de catecolaminas (URHAUSEN *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2006).

A mensuração das catecolaminas pode fornecer informações sobre alterações bioquímicas diante de uma carga de exercício e ser correlacionada com a intensidade do treinamento visando minimizar o estresse imposto (KNOPFLI *et al.*, 2001). Com isso, análises de catecolaminas urinárias parecem indicar um estado de funcionalidade do sistema nervoso simpático. Lehmann *et al.* (1997) descreveram que o *overtraining* em atletas de *endurance* causou diminuição noturna da excreção urinária de catecolaminas. Steinle (1997) relatou que uma diminuição na excreção de catecolaminas pode indicar a presença de fadiga central, devido à correlação negativa encontrada entre a excreção de catecolaminas e a latência da fase REM do sono ($r=-0,46$; $p<0,01$) (SILVA *et al.*, 2006).

A elevada concentração plasmática de catecolaminas tem sido relacionada a indivíduos em *overtraining* (HOOPER *et al.*, 1993). Lehmann *et al.* (1992) observaram aumentos significativos de noradrenalina no repouso em indivíduos durante um período intenso de treinamento; no entanto esses resultados não puderam ser reproduzidos por Urhausen *et al.* (1998), pois estes não encontraram diferenças nas concentrações plasmáticas de catecolaminas em atletas em *overtraining*. Halson & Jeukendrup (2004) afirmaram que essas diferenças encontradas podem ser atribuídas às diferentes metodologias aplicadas entre os autores e às diferenças interindividuais dos sujeitos utilizados. Mesmo assim, Atlaoui *et al.* (2007) relataram que a determinação das catecolaminas pode ser utilizada como um marcador do nível de estresse do treinamento, já que diferenças foram encontradas com os parâmetros de *performance*.

Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), Hormônio do Crescimento (GH)

Além dos hormônios testosterona e cortisol, a mensuração plasmática de outros hormônios é utilizada para diagnosticar o estado de treinamento em atletas. Urhausen *et al.* (1998) relataram baixas concentrações de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio do crescimento (GH) em atletas em *overtraining*. Com relação aos estados de anabolismo e catabolismo, o eixo GH – Fator de Crescimento Insulínico-I (IGF-I) é um sistema que integra mediadores, receptores e proteínas ligantes que modulam o desenvolvimento de muitos tecidos e também estão envolvidos com a adaptação ao exercício. Nemet *et al.* (2002) demonstraram decréscimo de elementos do eixo GH-IGF-I na circulação após exercício aeróbio e intenso em adolescentes. Concomitantemente, neste mesmo estudo foi observada elevação das concentrações de citocinas inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e Interleucina-1beta (IL-1 β).

O exato mecanismo de supressão do eixo GH-IGF-I não é totalmente conhecido; entretanto Scheett *et al.* (2002) relataram que o envolvimento das citocinas proinflamatórias

circulantes, IL-1 β , e TNF- α , cujas concentrações são elevadas pelo exercício extenuante, pode induzir a diminuição da concentração circulante de IGF-I, por meio de inúmeras vias, principalmente pela atenuação da bioatividade do IGF-I via aumento da inibição das proteínas ligantes de IGF (IGFBPs). A IGFBP-3 é responsável por mais de 90% da ligação do IGF-I, tendo sido sugerido que ela pode ativar a bioatividade anabólica do IGF-I. Por outro lado, a IGFBP-1, IL-1 β e TNF- α são indicadores de atividade catabólica e inibem o IGF-I.

RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS AO *OVERTRAINING*

Hematócrito e eritrócitos

Dentre os principais indicativos hematológicos do *overtraining*, a determinação do hematócrito ou eritrócitos é a mais utilizada, por ser um exame rápido e que necessita de apenas uma pequena quantidade de sangue. A mensuração do hematócrito possibilita, por meio de centrifugação sanguínea, identificar o percentual de glóbulos vermelhos ou hemácias no volume total de sangue, e sendo assim, essa técnica possibilita indicar alterações na viscosidade sanguínea. No entanto, essas análises não parecem apresentar relevância para o diagnóstico do *overtraing* como visto com outros marcadores.

Pesquisas vêm demonstrando que indivíduos em *overtraining* apresentam diminuição nos valores de hematócrito, eritrócito e viscosidade plasmática (MACKINNON *et al.*, 1997; VARLET-MARIE *et al.*, 2004). Varlet-Marie *et al.* (2006) mostraram que o hematócrito sofre variações específicas com o período do treinamento, embora a viscosidade sanguínea não indique sensivelmente as condições de *overtraining*. Mackinnon *et al.* (1997) verificaram que o índice de redução dos eritrócitos foi semelhante à diminuição da hemoglobina durante 4 semanas de treinamento de elevado volume em nadadores.

RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS AO *OVERTRAINING*

Fisiologicamente, indivíduos em *overtraining* apresentam depressão imunológica, diminuindo o número e a resposta mitogênica dos linfócitos e aumentando significativamente o índice de contração de doenças infecciosas. Uma das razões para esse arrefecimento do sistema imunológico é o aumento exacerbado dos hormônios de estresse, como cortisol. Desse modo, o *overtraining* provoca também alterações no estado das citocinas, células brancas e da glutamina.

Glutamina

A glutamina é o principal substrato energético para células do sistema imunológico, principalmente para os linfócitos e macrófagos, exercendo importantes funções na manutenção do sistema imunológico, na regulação da síntese e degradação de proteínas, no controle do volume celular, na desintoxicação corporal do nitrogênio e da amônia, entre outras. A deficiência de glutamina deprime o sistema imunológico, podendo levar o atleta a infecções e doenças do trato respiratório.

Em relação ao *overtraining*, Parry-Billings *et al.* (1992) reportaram que as concentrações de glutamina foram reduzidas significativamente em indivíduos em *overtraining*, em comparação ao grupo-controle. Kargotich *et al.* (2005) verificaram significativas reduções desse aminoácido após inúmeras sessões intensas de treinamento. No entanto, Halson & Jeukendrup (2004) afirmaram que as concentrações de glutamina nem sempre se alteram no *overtraining*.

Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos que compreendem um grupo muito extenso de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células, através de um processo

análogo ao dos hormônios, durante o desencadeamento das respostas imunes (SILVA *et al.*, 2006). As citocinas podem ser produzidas por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos e outras que não sejam linfóides. Todas as citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos e podem ser enquadradas em diversas classificações, como: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF α e TNF β) e fator de transformação de crescimento (TGF β).

Em relação ao exercício físico, as principais citocinas estudadas são a IL-6 e TNF α . A IL-6 é uma proteína produzida principalmente por células brancas T. É sintetizada pelos macrófagos e possui a função de ativar os linfócitos para determinada região tecidual específica, mantendo-se elevada em resposta ao exercício físico (OSTROWSKI *et al.*, 2000). A imunossupressão causada durante um longo período de estresse físico pode provocar aumento de citocinas e mau funcionamento do sistema imune, levando o atleta ao *overtraining*. SHARP *et al.* (1992), em revisão de literatura, verificaram que a resposta inflamatória aumenta durante o *overtraining*, elevando a produção de citocinas.

O TNF α regula as células imunes do organismo, causando morte por apoptose, proliferação e diferenciação celular e podendo originar tumores e replicação viral. Como o TNF α está envolvido em inflações orgânicas, durante o *overtraining* sua resposta inflamatória a uma lesão muscular e a supressão do sistema imunológico são aumentadas (SMITH *et al.*, 2000). Silva *et al.* (2006) relataram que o aumento das citocinas em resposta ao exercício físico ocorre principalmente nas atividades em que a contração é excêntrica. Bruunsgaard *et al.* (1997) compararam o efeito da contração excêntrica e concêntrica sobre a elevação de citocinas e de CK. Esse estudo demonstrou que a concentração de citocinas aumentou muitas vezes após o exercício excêntrico, indicando que a intensidade e volume de treinamento associado com recuperação insuficiente seria uma das causas do *overtraining*, devido às microlesões musculares, que podem gerar respostas inflamatórias.

No *quadro* Halson *et al.* (2003), constaram em ciclistas em *overtraining* que, mesmo diminuindo a *performance*, as citocinas não se alteraram durante o treinamento intenso de duas semanas, verificando-se apenas variações na relação glutamina/glutamato.

Respostas imunológicas

Períodos prolongados de estresse físico podem causar depressão temporária em vários aspectos da função imunológica. Períodos de intensificação do treinamento associados ao *overtraining* estão diretamente relacionados a disfunções imunológicas, aumentando o índice de infecções (GLEESON, 2006). Contudo, em indivíduos normais tem-se visto que em intensidade e volume moderados de treinamento ocorrem as melhores respostas imunes, quando comparados a intensidades baixas e elevadas (Figura 3).

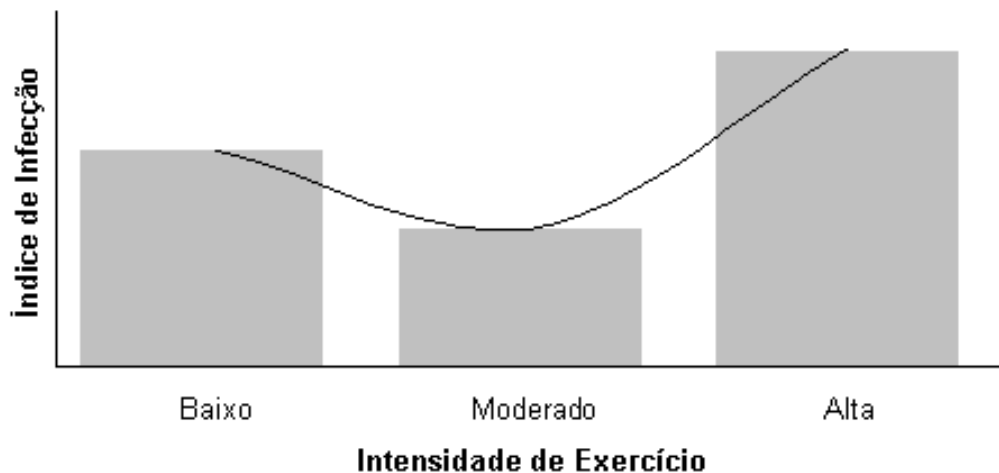


Figura 3. Risco de infecção em relação a variações na intensidade e volume do treinamento em indivíduos normais. *Adaptado de Malm (2006).*

Nieman (1994) verificou que existem relações entre índice de infecções e alterações na intensidade e volume do treinamento. Desse modo, atividades em intensidades moderadas de exercício evitam possíveis danos ao sistema imunológico, protegendo e prevenindo inflamações e infecções do trato respiratório. Malm (2006) analisou a susceptibilidade de

infecções em atletas de elite e relatou que não existe deficiência do sistema imunológico nessa população, e propôs outro comportamento da relação entre índice de infecção e variações na intensidade do treinamento (Figura 4). Glesson (2006) relatou que atletas de elite possuem uma adaptação positiva do sistema imunológico diminuindo o risco de infecções do trato-respiratório mesmo realizando altas cargas e volume de treinamento.

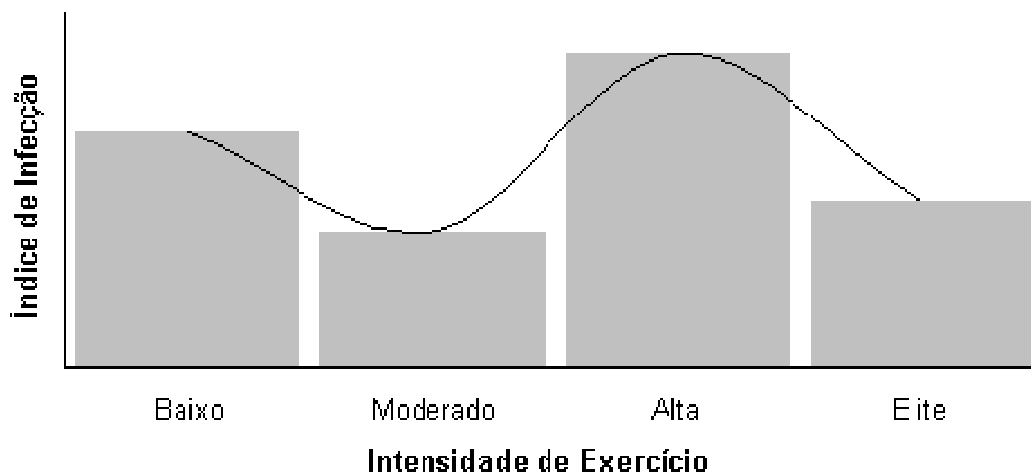


Figura 4. Risco de infecção em relação a variações na intensidade e volume do treinamento em atletas de elite. Proposta de S- invertido para o índice de infecção. *Adaptado de Malm (2006).*

Células imunológicas

Com relação às células do sistema imunológico ocorrem alterações nos números/contagens de leucócitos e neutrófilos após sessões de exercício (ROSA & VAISBERG, 2002). Imediatamente após o exercício essas células se encontram aumentadas, possivelmente devido a eventuais aumentos dos hormônios do estresse, como adrenalina e cortisol. Após um período de recuperação de aproximadamente 30 minutos se verifica queda nos neutrófilos e leucócitos (ROSA & VAISBERG, 2002). Outras células do sistema imunológico parecem responder semelhantemente aos leucócitos. Não obstante, é verificado

que a intensidade do esforço e o treinamento a longo prazo podem provocar respostas adaptativas, diminuindo a incidência de doenças infecciosas e o *overtraining*.

O *overtraining*, como está associado a um aumento excessivo das cargas de treinamento, faz diminuir o número dessas células de defesa (MATVIENKO, 1981). No entanto, Lehmann *et al.* (1996) e Halson *et al.* (2003) verificaram que não existe variação do número de leucócitos eosinófilos e linfócitos em atletas em *overtraining*. Mesmo assim, Silva *et al.* (2006) relataram que as principais diminuições das células de defesa em atletas em *overtraining* acontecem com os eosinófilos (FRY *et al.*, 1992; GABRIEL *et al.*, 1998).

OUTROS MARCADORES DE *OVERTRAINING*

A constante busca de novos marcadores que identificam precisamente o estado de *overtraining* tem possibilitado utilizar técnicas laboratoriais recentes que possam identificar conseqüências do *overtraining* a nível molecular.

Heat-Shock Proteins (HSP)

As proteínas de estresse, principalmente HSP70, HSP90 e gp96 e HSP 60, agem tanto como sinalizadoras de dano celular quanto como carregadoras de antígeno para a resposta imune (MULTHOFF, 2006). As HSs respondem imediatamente em diversas situações, tais como fagocitose e inflamação, e atuam como antígenos. Essas proteínas bloqueiam a transcrição de genes dependentes do fator nuclear NF- κ B, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. As proteínas de choque térmico têm-se mostrado um mecanismo relevante no reparo das células musculares em resposta à prática de exercícios físicos extenuantes; além disso, a expressão das HSPs é alterada pelo aumento da temperatura (HARRIS & STARNES, 2001), estresse metabólico, (FEBBRAIO & KOUKOULAS, 2000), hipóxia/isquemia

(MESTRIL *et al.*, 1994), secreção de catecolaminas (PAROO & NOBLE, 1999), aumento do cálcio intracelular (KIANG *et al.*, 1994) e espécies reativas do oxigênio (ZOU *et al.*, 1998).

Poucos estudos avaliaram os efeitos do *overtraining* sobre as HSPs. Esses estudos tiveram ênfase nos efeitos de exercícios agudos e crônicos sobre a expressão das HSPs em resposta às lesões teciduais (SCHNEIDER *et al.*, 2002; THOMPSON *et al.*, 2003). Lehmann *et al.* (1997) relataram que durante o estado de *overtraining* há aumento da síntese da HSP70 como mecanismo reparador celular. Zoppi & Macedo (2007) consideraram três semanas de treinamento de *endurance* em esteira como suficientes para gerar o *overtraining* em ratos. Esses autores verificaram aumento na expressão da HSP72 principalmente em fibras oxidativas (Tipo I), demonstrando que os períodos e características do treinamento podem interferir em sua expressão.

Espécies reativas de oxigênio (EROS)

O aumento do consumo de oxigênio (O_2) durante o esforço físico leva ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Nesse sentido, Jenkins & Goldfarb (1993) verificaram que 2 a 5% do O_2 consumido dão origem a EROs, as quais contribuem efetivamente para o desequilíbrio intracelular, devido à sua capacidade de peroxidação lipídica carbonilação protéica e de causar danos ao DNA, podendo levar à morte celular. Com o objetivo de diminuir a ação tóxica das EROs, o organismo dispõe de um sistema de defesa antioxidante com enzimas protetoras: citocromo c oxidase, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase e redutase (DÉKÁNY *et al.*, 2006).

Análises da atividade e expressão das enzimas antioxidantes têm sido utilizadas para verificar o nível de ataque oxidativo gerado pelo treinamento. Sabe-se que o exercício físico intenso desencadeia o estresse oxidativo, que, por sua vez, provoca diminuição do desempenho físico, fadiga muscular, danos musculares no *overtraining* e alterações importantes no sistema imune (ALESSIO *et al.*, 2000). Lamprecht *et al.* (2004) relataram que

danos musculares causados por EROs são mais acentuados em indivíduos pouco treinados que realizam exercícios com intensidade e duração acima da sua condição física. Miyazaki *et al.* (2001) verificaram que o treinamento moderado minimiza os efeitos do estresse oxidativo ao exercício agudo de alta intensidade. Aumentos significativos de CAT e GP indicam que essas enzimas podem ser utilizadas como marcadores de *overtraining* (MARGONIS *et al.*, 2007), em virtude de serem produzidas como resposta adaptativa a um treinamento.

Leptina

A leptina é um hormônio produzido no tecido adiposo, sendo responsável pelo controle da saciedade. A principal ação da leptina é inibir os neurotransmissores onorexígenos (neuropeptídeo Y e AGRP) e ativar substâncias anorexígenas. Estudos têm verificado que as concentrações de leptina podem ser influenciadas por diversos fatores fisiológicos, como, por exemplo, fatores hormonais (concentração de insulina e glicocorticoides). Além disso, várias citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-6, também aumentam a expressão de leptina (SARRAF *et al.*, 1997). Ainda não se conhece o mecanismo envolvido na variabilidade da leptina durante o exercício, porém suas concentrações circulantes aumentam em indivíduos em *overtraining* (PETIBOIS *et al.*, 2002).

Respostas do DNA Plasmático

O DNA circulante pode estar alterado em condições traumáticas, gravidez, inflamações e câncer. FATOUROS *et al.* (2006) verificaram que a concentração de DNA no plasma fica alterada em diferentes períodos de treinamento ao longo de um treinamento resistido (Figura 5).

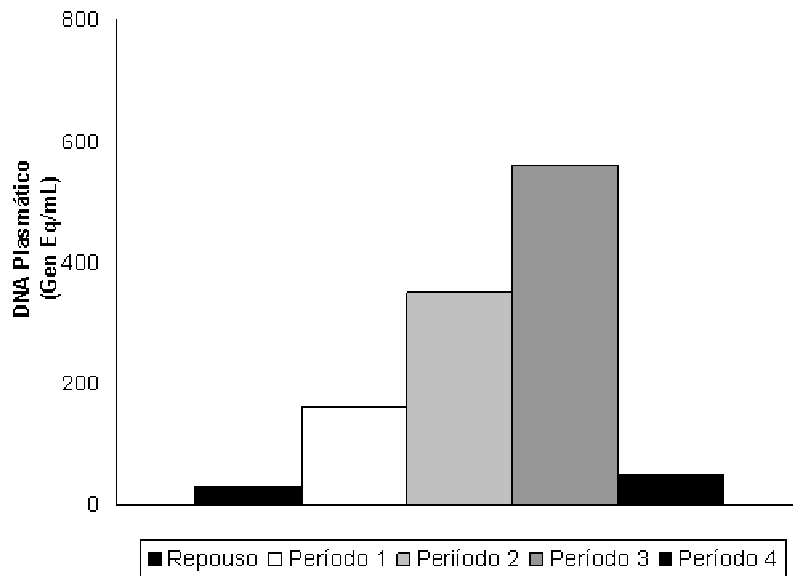


Figura 5. Concentração de DNA no plasma em 17 participantes, medida após exercício resistido de baixo (Período 1), alto (Período 2), muito alto (Período 3) e baixo volume (Período 4). *Adaptado de Fatouros et al. (2006).*

Esse achado demonstra que a concentração plasmática de DNA aumenta em proporção à carga de treinamento, sugerindo que o DNA pode ser um marcador sensível para monitorar e quantificar o *overtraining* em atletas. Além disso, valores de CK e Uréia responderam de forma semelhante ao DNA plasmático durante os diferentes períodos do treinamento.

CONCLUSÃO

O crescente desenvolvimento da ciência no âmbito esportivo vem proporcionando novos métodos de treinamento físico para que se alcance o máximo desempenho dos atletas. No entanto, devido à constante exigência de bons resultados, a densos calendários competitivos bem como a tempos inadequados de recuperação, alguns princípios do treinamento não são respeitados, excedendo muitas vezes o limite individual de cada atleta e

desencadeando *overtraining*. O *overtraining* é uma desordem fisiológica que acomete principalmente atletas, podendo resultar em diminuição da *performance*, excesso de fadiga, enfermidades e outros desequilíbrios metabólicos. Para se diagnosticar com precisão o *overtraining*, é extremamente importante a associação de alguns biomarcadores hormonais, bioquímicos, imunológicos, enzimáticos e moleculares, juntamente com as variáveis de *performance*. No entanto, na literatura ainda não há um consenso quanto ao melhor indicador fisiológico, devido à grande variabilidade das respostas encontradas por diferentes pesquisadores. Por outro lado, as alterações hormonais, bioquímicas e de *performance*, mesmo com contradições, são as mais utilizadas atualmente para a caracterização do *overtraining*, devido à ampla literatura disponível e às suas boas associações com os diferentes períodos de treinamento. Contudo, outros indicadores de estresse orgânico por exercícios físicos, como as proteínas de choque térmico, enzimas antioxidantes e DNA livre, vêm sendo mensurados com o objetivo de melhor monitorar o treinamento, com vista a prevenir o *overtraining* ou promover uma eficaz recuperação dos indivíduos por ele afetados.

Agradecimentos: Suporte Técnico e Financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 06/58411-2) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHTEN, J.; JEUKENDRUP, A.E. Heart rate monitoring: applications and limitations. *Sports Med.* 33(7):517-38, 2003.
2. ALESSIO, H.M.; HAGERMAN, A.E.; FULKERSON, B.K.; AMBROSE, J.; RICE, R.E.; WILEY, R.L. Generation of reactive oxygenspecies after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci. Sports Exerc.*32:1576-1581, 2000.

3. ATLAOUI, D.; PICHOT, V.; LACOSTE, L.; BARALE, F.; LACOUR, JR.; CHATARD, J.R. Heart rate variability, training variation and performance in elite swimmers. *Int. J. Sports Med.* 28(5) :394-400, 2007.
4. ATLAOUI, D. ; DUCLOS, M. ; GOUARNE, C. ; LACOSTE, L. ; BARALE, F. ; CHATARD, J.C. 24-hr urinary catecholamine excretion, training and performance in elite swimmers. *Int. J. Sports Med.* 27(4):314-21, 2006.
5. BAPTISTA, C.A.S.; GHORAYEB, N.; DIOGUARDI, G.S. Sobretraining. In Ghorayeb N, Barros T (ed). *O Exercício*. São Paulo: Atheneu, 313-320, 1999.
6. BANFI, G.; DOLCI, A. Free testosterone/cortisol ratio in soccer: usefulness of a categorization of values. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 46(4):611-6, 2006.
7. BANFI, G.; MARINELLI, M.; ROI, G.S.; AGAPE, V. Usefulness of free testosterone/cortisol ratio during a season of elite speed skating athletes. *Int. J. Sports Med.* 14(7):373-9, 1993.
8. BARRON, J.L.; NOAKES, T.D.; LEVY, W.; SMITH, C.; MILLAR, R.P. Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 60(4):803-6, 1985.
9. BOSQUET, L.; LEGER, L.; LEGROS, P. Blood Lactate Response to overtraining in male athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 84: 107-114, 2001.
10. BONIFAZI, M.; SARDELLA, F.; LUPPO, C. Preparatory versus main competitions: effects of training on performance, lactate responses and pre-competition plasma cortisol concentration in elite male swimmers. *Eur. J. Appl. Physiol.* 82(5-6): 368-373, 2000.
11. BROOKS, G.A.; FAHEY, T.D.; WHITE, T.P. *Exercise Physiology: human bioenergetics and its application*, 2nd edn. Mayfield. Mountain View Calif.

12. BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; JOHANSEN, T.L.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Exercise-induced increase in interleukin-6 is related to muscle damage. *J. Physiol.* 499:833-841, 1997.
13. COSTILL, D.L.; FLYNN, M.G.; KIRWAN, J.P.; HOUMARD, J.A.; MITCHELL, J.B.; THOMAS, R.; PARK, S.H. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 20(3):249-54, 1998.
14. COSTILL, D. L.; THOMAS, R.; ROBERGS, R. A.; PASCOE, D.; LAMBERT, C.; BARR, S.; FINK, W. J. Adaptations to swimming training: influence of training volume. *□éd. Sci. Sports Exerc.* 23:371-377, 1991.
15. CUNHA, G.S.; RIBEIRO, J.R.; OLIVEIRA, A.R. Sobretreinamento: Teorias diagnósticos e marcadores. *Rev Bras Med Esporte* 12(5), 2006.
16. DÉKÁNY, M.; NEMESKÉRI, V.; GYÖRE, I.; HARBULA, I.; MALOMSOKI, J.; PUCSOK, J. Antioxidant Status of Interval-Trained Athletes in Various Sports. *Int . Sports Med.* 27, 112-116, 2006.
17. DUCLOS, M. ; GUINOT, M. ; Le BOUC, Y. Cortisol and GH: odd and controversial ideas. *Appl Physiol. Nutr. Metab.* 32(5):895-903, 2007.
18. FATOUROS, I.G.; DESTOUNI, A.; MARGONIS, K.; JAMURTAS, A.Z.; VRETTOU, C.; KOURETAS, D.; MASTORAKOS, G.; MITRAKOU, A.; TAXILDARIS, K.; KANAVAKIS, E.; PAPASSOTIRIOU, I. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clin. Chem.* 52(9):1820-4, 2006.

19. FEBBRAIO, M.A.; KOUKOULAS, I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J. Appl. Phys.* 89: 1055-1060, 2000.
20. FLYNN, M. G.; PIZZA, F.X.; BOONE, J.R.B.J.; ABDRES, F. F.; MICHAUD, T. A.; RODRIGUES-ZAYAS, J. R. Indices of training Stress During Competitive Running and Swimming Seasons. *Int. J. Sports Med.* 15, 21-26, 1994.
21. FRY, R.W.; MORTON, A.R.; GARCIA-WEBB, P.; CRAWFORD, G.P.; KEAST, D. Biological responses to overload training in endurance sports. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 64(4):335-44, 1992.
22. GABRIEL, H.H.; URHAUSEN, A.; VALET, G.; HEIDELBACH, U.; KINDERMANN, W. Overtraining and immune system: A prospective longitudinal study in endurance athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30: 1151-1157, 1998.
23. GLADDEN, L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J. Physiol.* 1;558(Pt 1):5-30, 2004.
24. GLEESON, M. Immune system adaptation in elite athletes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 9(6):659-65, 2006.
25. HALSON, S.; JEUKENDRUP, A. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med.* 34(14):967-981, 2004.
26. HALSON, S.L.; LANCASTER, G.I.; JEUKENDRUP, A.E.; GLEESON, M. Immunological responses to overreaching in cyclists. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35(5):854-61, 2003.
27. HARRIS, M.B.; STARNES, J.W. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280: 2271–2280, 2001.

28. HEDELIN, R.; KENTTA, G.; WIKLUND, U.; BJERLE, P.; HENRIKSSON-LARSEN, K. Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32(8):1480-4, 2000.
29. HOOPER, S.L.; MACKINNON, L.T.; GORDON, R.D.; BACHMANN, A.W. Hormonal responses of elite swimmers to overtraining. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 741-747, 1993.
30. HYNYNEN, E.; USITALO, A.; KONTTINEN, N.; RUSKO, H. I rate variability during night sleep and awakening in overtrained athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38(2): 313-317, 2006.
31. ISRAEL, S.Z. Problematik des übertrainings aus internisistischer und leistungsphysiologischer sicht. *Med. Sport .* 16: 1-12, 1976.
32. JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 210-212, 1993.
33. JEUKENDRUP, A.E.; HESSELLINK, M.K.C.; SNYDER, A.C.; KUIPERS, H.; KEIZER, H.A. Physiological changes in male competitive cyclists after two weeks of intensified training. *Int. J. Sports Med.* 13: 534-541, 1992.
34. KARGOTICH, S.; GOODMAN, C.; DAWSON, B.; MORTON, A.R.; KEAST, D.; JOSKE, D.J. Plasma glutamine responses to high-intensity exercise before and after endurance training. *Res. Sports Med.* 13(4):287-300, 2005.
35. KIANG, J.G.; CARR, F.E.; BURNS, M.R.; MCCLAIN, D.E. HSP-72 synthesis is promoted by increase in [Ca²⁺]_i or activation of G proteins but not pHi or cAMP. *Am. J. Physiol.* 267: C104-C114, 1994.
36. KIRWAN, J. P.; COSTILL, D. L.; FYNN, M. G.; MITCHELL, J. B.; FINK, W. J.; NEUFER, P. HOUMARD, J. A. Physiological responses to successive days of intense training in competitive swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20:255-259, 1988.

37. KNOPFLI, B.; CALVERT, R.; BAR-OR, O.; VILLIGER, B.; VON DUVILLARD, S.P. Competition performance and basal nocturnal catecholamine excretion in cross-country skiers. *Med Sci Sports Exerc.* 33(7):1228-32, 2001.
38. KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.*30(7):1137-9, 1998.
39. LAMPRECHT, M.; GREILBERGER, J.; OETTI, K. Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. *Nutrition.* 20: 728-730, 2004.
40. LEHMANN, M.; DICKHUTH, H.H.; GENDRISCH, G.; LAZAR, W.; THUMM KAMINSKY, R.; ARAMEND, J.F.; PETERKE, E.; WIELAND, W.; KEUL, J. Training-overtraining: a prospective, experimental study with experienced middle and long distance runners. *Int. J. Sports Med.*12: 444-452, 1991.
41. LEHMANN, M.; GASTMANN, U.; PETERSEN, K.G.; BACHL, N.; SEIDEL, A.; KHALAF, A.N.; FISCHER, S.; KEUL, J. Training-overtraining: performance and hormonal levels after a defined increase in training volume vs. intensity in experienced middle and long-distance runners. *Br. J. Sports Med.* 26: 233-242, 1992.
42. LEHMANN, M.; MANN, H.; GASTMANN, U.; KEUL, J.; VETTER, D.; STEINACKER, J.M.; HAUSSINGER, D. Unaccustomed high-mileage vs intensity training-related changes in performance and serum amino acid levels. *Int. J. Sports Med.* 17: 187-192, 1996.
43. LEHMANN, M.J.; LORMES, W.; OPITZ-GRESS, A.; STEINACKER, J.M.; NETZER, N.; FOSTER C, GASTMANN U. Training and overtraining: an overview and experimental results in endurance sports. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 37(1):7-17, 1997.
44. LOWERY, L.; FORSYTHE, C.E. Protein and overtraining: potential applications for free-living athletes. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 5(3):42-50, 2006.

45. MACKINNON, L.T.; HOOPER, S.L.; JONES, S.; GORDON, R.D.; BACHMANN, A. Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29: 1637-1645, 1997.
46. MACKINNON, L.T. Chronic exercise training effects on immune function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32(7Suppl):369-76, 2000.
47. MALM, C. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 16(1):4-6, 2006.
48. MARGONIS, K.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z.; NIKOLAIDIS, M.G.; DOUROUDOS, I.; CHATZINIKOLAOU, A.; MITRAKOU, A.; MASTORAKOS, G.; PAPASSOTIRIOU, I.; TAXILDARIS, K.; KOURETAS, D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic. Biol .Med.* 15;43(6):901-10, 2007.
49. MATVIENKO, L.A. A study of peripheral blood in track and field athletes. *Sov. Sports Rev.*16: 50-51, 1981.
50. MESTRIL, R, C.H.I.S.C.; SAYEN, M.R.; DILLMANN, W.H. Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. *Biochem. J.* 298: 561-569, 1994.
51. MORGAN, W.P.; BROWN, D.R.; RAGLIN, J.S.; O'CONNOR, P.J.; ELLICKSON, K.A. Physiological monitoring of overtraining and staleness. *Br J Sports Med* 21: 107-114, 1987.
52. MIAZAKI, H.; OH-ISHI, S.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; TOSHINAI, K.; HA, S.; HAGA, S.; JI, L.L.; OHNO, H. Strenuous endurance training in humans reduce oxidative stress following exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 84:1-6, 2001.
53. MILIAS, G.A.; NOMIKOS, T.; FRAGOPOULOU, E.; ATHANASOPOULOS, S.; ANTONOPOULOU, S. Effects of eccentric exercise-induced muscle injury on blood

- levels of platelet activating factor (PAF) and other inflammatory markers. *Eur. J. Appl. Physiol.* 95(5-6):504-13, 2005.
54. MUJIKA, I.; PADILLA, S.; PYNE, D.; BUSSO, T. Physiological Changes Associated with the Pre-Event Taper in Athletes. *Sports Med.* 34(13):891-927, 2004.
55. MULTHOFF, G. Heat shock proteins in immunity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 172: 279-304, 2006.
56. NEMET, D.; OH, Y.; KIM, H.S.; HILL, M.A.; COOPER, D.M. The effect of intense exercise on inflammatory cytokines and growth mediators in adolescent boys. *Pediatrics.* 110(4):681-698, 2002.
57. NIELSEN, H.B.; CLEMMESSEN, J.O.; SKAK, C.; OTT, P.; SECHER, N.H. Attenuated hepatosplanchnic uptake of lactate during intense exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 92(4):1677-83, 2002.
58. NIEMAN, D.C. Exercise, infection, and immunity. *Int J Sports Med.* 15 Suppl 3:S131-41, 1994.
59. OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B.K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans—effect of intensity of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 83(6):512-5, 2000.
60. PAROLIN, M.L.; CHESLEY, A.; MATSOS, M.P.; SPRIET, L.L.; JONES, N.L.; HEIGENHAUSER, G.J. Regulation of skeletal muscle glycogen phosphorylase and PDH during maximal intermittent exercise. *Am. J. Physiol.* 277(5 Pt 1):E890-900, 1999.
61. PAROO, Z.; NOBLE, E.G. Isoproterenol potentiates exercise-induction of Hsp70 in cardiac and skeletal muscle. *Cell. Stress Chaperones.* 4:199-204, 1999.
62. PARRY-BILLINGS, M.; BUDGETT, R.; KOUTEDAKIS, Y.; BLOMSTRAND, E.; BROOKS, S.; WILLIAMS, C.; CALDER, P.C.; PILLING, S.; BAIGRIE, R.;

- NEWSHOLME, E.A. Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24(12):1353-8, 1992.
63. PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; POORTMANS, J.R.; DELERIS, G. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports: a review. *Sports Med.* 32(13):867-78, 2002.
64. ROSA, L.F.P.B. ; VAISBERG, M.W. Exercise influence on immune response. *Rev. Bras. Med Esporte.* 8:4, 2002.
65. ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; GARCIA-WEBB, P.; MORTON, A.R. Training adaptation and biological changes among well-trained male triathletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29(9):1233-9, 1997.
66. SARRAF, P.; FREDERICH, R.C.; TURNER, E.M.; MA, G.; JASKOWIAK, N.T.; RIVET, D.J. 3RD, FLIER, J.S.; LOWELL, B.B.; FRAKER, D.L.; ALEXANDER, H.R. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J. Exp. Med.* 6;185(1):171-5, 1997.
67. SCHEETT, T.P.; NEMET, D.; STOPPANI, J.; MARESH, C.M.; NEWCOMB, R.; COOPER, D.M. The Effect of Endurance-Type Exercise Training on Growth Mediators and Inflammatory Cytokines in Pre-Pubertal and Early Pubertal Males. *Pediatr Res.* 52(4):491-497, 2002.
68. SCHNEIDER, D,A.; MCGUIGGIN, M.E.; KAMIMORI, G.H. A comparison of the blood lactate and plasma catecholamine thresholds in untrained male subjects. *Int. J. Sports Med.* 13(8):562-6, 1992.
69. SCHNEIDER, E.M.; NIESS, A.M.; LORENZ, I.; NORTHOFF, H.; FEHRENBACH, E. Inducible HSP70 expression analysis after heat and physical exercise: transcriptional, protein expression, and subcellular localization. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 973:8-12, 2002.

70. SHARP, N.C.; KOUTEDAKIS, Y. Sport and the overtraining syndrome: immunological aspects. *Br. Med. Bull.* 48(3):518-33, 1992.
71. SHULMAN, R.G. Glycogen turnover forms lactate during exercise. *Exerc. Sport Sci. Ver.* 33(4):157-62, 2005.
72. SILVA, A.S.R.; SANTHIAGO, V.; GOBATTO, C.A. Compreendendo o overtraining no desporto: da definição ao tratamento. *Ver. Port. Cien. Desp.* 6(2) 229–238, 2006.
73. SIMÕES, H.G.; MARCON, F.; OLIVEIRA, F.; CAMPBELL, C.S.G.; BALDISSERA, V.; COSTA ROSA, L.F.B.P. Resposta da razão testosterona/cortisol durante o treinamento de corredores velocistas e fundistas. *Rev. Brás. Educ. Fís. Esp.* 18, 31-46, 2004.
74. SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: 317-331, 2000.
75. SNYDER, A.C.; KUIPERS, H.; CHENG, B.; SERVAIS, R.; FRANSEN, E. Overtraining following intensified training with normal muscle glycogen. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27(7):1063-70, 1995.
76. SNYDER, A.C.; KUIPERS, H.; CHENG, B.; SERVAIS, R.; FRANSEN, E. Overtraining following intensified training with normal muscle glycogen. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27(7):1063-70, 1995.
77. SNYDER, A.C. Overtraining and glycogen depletion hypothesis. *Med Sci Sports Exerc.* 30(7):1146-50, 1998.
78. STEINACKER, J.M.; LORMES, W.; KELLMANN, M.; LIU, Y.; REISSNECKER, S.; OPITZ-GREES, A.; BALLER, B.; GUNTER, K.; PETERSEN, K.G.; KALLUS, K.W.; LEHMANN, M.; ALTENBURG, D. Training of junior rowers before world championships. Effects on performance, mood state and select hormonal an metabolic responses. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 40(4):327-335, 2000.

79. STEINLE, H. Influence of intensive exercise on sleep and breathing regulation in athletes. Dissertation, University of Freiburg: Freiburg. 1997.
80. THOMPSON, H.S.; MAYNARD, E.B.; MORALES, E.R.; SCORDILIS, S.P. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta. Physiol. Scand.* 178 (1): 61-72, 2003.
81. TOTSUKA, M.; NAKAJI, S.; SUZUKI, K.; SUGAWARA, K.; SATO, K. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. *J. Appl. Physiol.* 93(4):1280-6, 2002.
82. UCHIDA, M.C.; BACURAU, R.F.P.; NAVARRO, F.; PONTES, L.F.; TESSUTI, V.D.; MOREAU, R.L.; COSTA ROSA, L.F.B.P.; AOKI, M.S. Alteração da relação testosterona:cortisol induzida pelo treinamento de força em mulheres. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 2004,10(3):165-168.
83. URHAUSEN, A.; GABRIEL, H.; KINDERMANN, W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med.* 20(4):251- 276, 1995.
84. URHAUSEN, A.; GABRIEL, H.; KINDERMANN, W. Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30 : 407-414, 1998.
85. VARLET-MARIE, E. ; MASO, F. ; LAC, G. ; BRUN, J.F. Hemorheological disturbances in the overtraining syndrome. *Clin. Hemorheol .Microcirc.* 30(3-4):211-8, 2004.
86. VARLET-MARIE, E. ; MERCIER, J. ; BRUN, J.F. Is plasma viscosity a predictor of overtraining in athletes? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 35(1-2):329-32, 2006.
87. YAMAMOTO, Y.; MUTHO, Y.; MIYASHITA, M. Hematological and biochemical indices during the tapering period of competitive swimmers. In: *Swimming and Science V.* Champaign, IL: Human Kinetics. 243-249. 1988.

88. ZAVORSKY, G.S. Evidence and possible mechanisms of altered maximum heart rate with endurance training and tapering. *Sports* □éd. 29: 13-26, 2000.
89. ZOOPI, C.C.; ANTUNES-NETO, J.; CATANHO, F.O.; GOULART, L.F.; MOTTA, E.; MOURA N.; MACEDO, D.V. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Ver. Paul. Educ. Fís.*17: 119-130, 2003.
90. ZOPPI, C.C.; MACEDO, D.V. Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2 [Epub ahead of print], 2007.
91. ZOU, J.; SALMINEN, W.F.; ROBERTS, S.M.; VOELLMY, R. Correlation between glutathione oxidation and trimerization of heat shock factor 1, an early step in stress induction of the Hsp response. *Cell Stress Chaperones.* 3:130-141, 1998.

10.3 APÊNDICE 3

Araujo GG, Papoti M, Manchado-Gobatto FB, Mello MAR, Gobatto CA. Padronização de um Protocolo Experimental de Treinamento Periodizado em Natação Utilizando Ratos Wistar. Rev Bras Med Esporte – Vol. 16, No 1 – Jan/Fev, 2010.

RESUMO

Verificar os efeitos de 12 semanas de treinamento periodizado de natação em ratos sobre os valores de glicogênio muscular (GM) e hepático (GH), capacidade aeróbia (LAn) e anaeróbia (Tlim) e creatina quinase (CK). Foram utilizados 70 ratos da linhagem Wistar com 60 dias adaptados individualmente ao meio líquido por 2 semanas. Os animais foram divididos em grupos: Controle (GC n=40) e periodizado (GP n=30) e a intensidade do treinamento foi equivalente ao peso corporal do animal (% do PC). O treinamento (T) para o GP foi dividido em períodos preparatório Básico (PPB 6 semanas), Específico (PPE 4,5 semanas) e Polimento (PP 1,5 semanas), tendo como estímulos intensidades leve (4% do PC), moderada (5% do PC), pesada (6% do PC) e intensa (13% do PC). Vinte e quatro horas após a adaptação 10 ratos do GC foram sacrificados e avaliados pelo teste de lactato mínimo para mensuração dos valores de linha de base de GM, GH, CK, LAn e Tlim. Os animais restantes do GC e GP foram sacrificados (número de 10 animais) ao final de cada período de T. ANOVA two-way (Newman-Keuls, $P < 0,05$). O treinamento periodizado aumentou a concentração de glicogênio muscular ao final do período de polimento. O glicogênio hepático não alterou no GC, porém no GP houve redução significativa no início do período específico com elevação no período de polimento. A concentração de CK não modificou ao final dos PPB, PPE e PP. O LAn reduziu ao longo das 12 semanas de treinamento no GC mas ao final do PP no GP, o LAn não se alterou. O Tlim aumentou no PP. Desse modo pode-se concluir que o treinamento periodizado provocou supercompensação energética ao final da periodização. A capacidade anaeróbia aumentou no PP bem como o LAn que obteve maiores valores em relação ao GC nesse período.

Palavras Chave: Glicogênio, Capacidade Aeróbia, Capacidade Anaeróbia e Creatina Quinase.

ABSTRACT

The objective of this study was verify the training periodization responses on aerobic and anaerobic performance, glycogen concentration in muscle (M) and liver (L), and creatine kinase (CK) in rats swimming. Seventy males Wistar rats were separated randomly in two groups: Control Group (CG n=30) and Training Periodization Group (TPG n=30). All experiments were preceded by 2 weeks of individual adaptation to the water. The TPG has been carried through during a period of 12 weeks (w) with frequency of 6 days/w. The training period was subdivide in three specialized series blocks: Preparation (6 w), Specific (4.5 w) and Taper (1.5 w). The Lactate Minimun Test (LACm) was adapted to determine the aerobic capacity. The anaerobic performance was evaluated by maximal exhaustion time (Tlim) verified during hyperlactatemia induction phase in the LACm protocol. Stimulus of the training was based in corresponding intensities to the LACm: Endurance (END) 1= 80%; END2= 100%; END3= 120% and Anaerobic (ANA) 240% of the LACm. Anova Two-way and Newman-Keuls post-hoc test ($P<0.05$). The aerobic performances were not different to the initial training (Preparation: $4.57 \pm 0.24\%$ of the body weigh (bw); Specific: $4.59 \pm 0.44\%$ bw), but at the end of taper the LACm was higher (Taper: $5.01 \pm 0.71\%$ bw). The anaerobic parameter (Tlim) was significantly higher at the end of taper (73 ± 14 s) when compared to the Preparation (50 ± 13 s) and Specific blocks (65 ± 18 s). The CG reduced the LACm and anaerobic performances along to the experimental period. The glycogen M increased after taper and CK not alter during training. The training periodization to rats showed to be an important tool to evaluate specific effects of training. This is supported by sensitive responses of the rats along to the blocks, based by improvement of the aerobic and anaerobic performances as well as glycogen concentration obtained after taper block.

Key words: Glycogen, Aerobic Capacity, Anaerobic Capacity and Creatine Kinase.

INTRODUÇÃO

A periodização do treinamento, por possibilitar a maximização da *performance* e diminuição dos riscos de lesão e supertreinamento (Stone, 1990; Fry et al., 1992; Rowbottom, 2003), é uma estratégia frequentemente utilizada por técnicos de vários esportes, tais como a natação (Mujika et al., 1995), corrida (Martin & Coe, 1997), treinamento resistido (Poliquin, 1992; Kramer et al., 2003) dentre outros.

A principal característica da periodização do treinamento é a inter-relação das variáveis volume e intensidade, ministradas dentro de um período de tempo pré-definido, denominado macrociclo. A periodização é a subdivisão do macrociclo em menores períodos de modo que seja possível a prescrição sistematizada de cada uma das fases do treinamento. De modo geral, ao final da periodização, as cargas são reduzidas objetivando a supercompensação do sistema energético, melhorando assim a *performance* (Mujika et al., 2003; Luc & Busso, 2005).

Embora exista uma vasta literatura sugerindo diversas maneiras de periodizar o treinamento (Manso et al., 1996; Matveev, 1996; 1997; Kramer et al., 2000; Bompa, 2002), ainda é escasso o embasamento científico que justifique a utilização de um determinado modelo de periodização (Fry et al., 1992), provavelmente pela inviabilidade da implementação de novos métodos de treinamento no âmbito competitivo e, principalmente, pela inexistência de modelos humanos absolutamente bem controlados.

Desse modo, a utilização de modelos animais em programas de treinamento pode ser uma ferramenta importante na manipulação das variáveis volume e intensidade, uma vez que o sistema fisiológico, bem como suas respostas ao exercício, são semelhantes às encontradas em seres humanos (Gobatto et al., 2001; Voltarelli et al., 2002; Manchado et al., 2006; deAraujo et al., 2007). Pesquisar métodos de treinamento nesses animais possibilita melhor

controlar as respostas fisiológicas geradas em diferentes períodos do treinamento por meio de tratamento e análises bioquímicas mais precisas.

Considerando a necessidade de estudos empenhados em investigar os modelos de treinamento periodizado, juntamente com a crescente quantidade de trabalhos que verificam a influência do exercício físico em modelos animais, bem como a viabilidade e bom controle de procedimentos, intervenções e análises laboratoriais (Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2006; deAraujo et al., 2007; Contarteze et al., 2007), o presente estudo objetivou padronizar um protocolo experimental de treinamento periodizado em natação utilizando ratos Wistar para avaliar precisamente variáveis de *performance* aeróbia e anaeróbia, substratos energéticos e marcadores bioquímicos ao longo de 12 semanas de treinamento físico. Especificamente, foram dosados ao final de cada período do treinamento concentração de glicogênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio, glicogênio hepático e concentração de creatina quinase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 70 ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 60 dias de idade. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, não excedendo 5 ratos por gaiola, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os animais receberam ração comercial e água “*ad libitum*”. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos: controle (GC n= 40) e periodizado (GP n=30). Todos os experimentos envolvendo animais experimentais foram realizados de acordo com a resolução Brasileira de experimentação com animais (Projeto de Lei no 93/08, aprovado em 9 de Setembro de 2008) o qual respeita as mesmas normas da Sociedade Americana de Fisiologia para pesquisa.

Adaptação ao meio líquido

Os ratos foram adaptados ao meio líquido ($31\pm 1^\circ\text{C}$) por 3 semanas, em tanques cilíndricos individuais profundos (120 x 60 cm). A partir da 2ª semana de adaptação, os animais suportaram sobrecargas equivalentes a 2% do peso corporal (PC).

Performances anaeróbia e aeróbia

As *performances* aeróbia e anaeróbia foram assumidas como intensidade de lactato mínimo (LM) e tempo limite (Tlim). Para determinação dessas variáveis, foi utilizado o protocolo de lactato mínimo (LM) validado por Tegtbur et al. (1993) em humanos, aplicado a ratos por Voltarelli et al. (2002) e aprimorado para esses animais por deAraujo et al. (2007).

O procedimento de avaliação da *performance* anaeróbia serviu como método para indução da hiperlactacidemia com uma carga correspondente a 13% do PC. Os animais realizaram 2 esforços nessa primeira fase do teste sendo o primeiro com duração de 30 s e após intervalo de 30 s, a realização do segundo esforço na mesma carga até exaustão (Tlim). Amostras sanguíneas (25 μL) foram coletadas da extremidade distal da cauda aos 1, 3, 5, 7 e 9 min após o Tlim para determinação da concentração pico de lactato ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Imediatamente após 9 minutos de intervalo passivo, os ratos foram submetidos a um teste incremental para determinação da intensidade de LM (*performance* aeróbia) correspondente ao equilíbrio entre remoção e produção do lactato. As cargas foram equivalentes a 4,0- 4,5- 5,0- 5,5- 6,0 e 7,0% do PC de cada animal. Cada estágio do protocolo progressivo foi composto por 5 minutos de duração com intervalo de 30 s para determinação da lactacidemia. A relação obtida entre a concentração de lactato e a carga (porcentagem do peso corporal) foi ajustada por uma equação polinomial de ordem 2, sendo que LM foi considerado a derivada zero desse ajuste (deAraujo et al., 2007).

A figura 1 mostra o exemplo gráfico de 1 rato submetido ao teste progressivo realizado após a indução da lactacidemia e o ajuste polinomial de ordem 2.

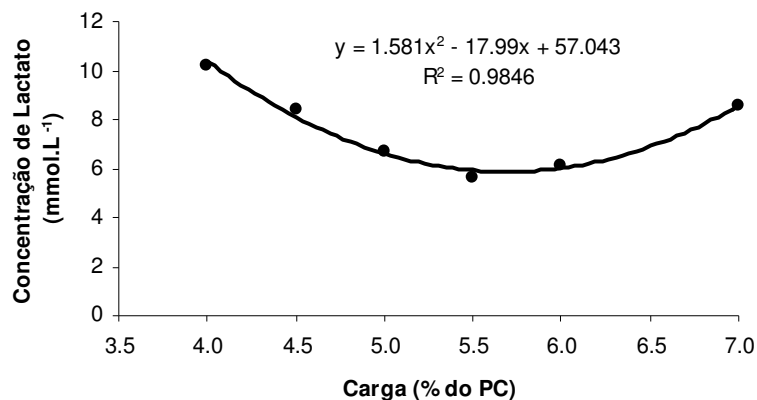


Figura 1. Fase progressiva do teste de lactato mínimo ajustada pela função polinomial de ordem 2. Exemplo retirado de um animal do GP após a adaptação.

Sessões de treinamento: Classificação e Quantificação dos estímulos aplicados

Os animais controles (GC) não foram submetidos ao exercício crônico, mas foram manipulados ao mesmo horário e local dos animais do grupo periodizado (GP).

Os estímulos aplicados durante as sessões de treinamento para o GP foram divididos em séries objetivando o desenvolvimento da aptidão aeróbia e anaeróbia. O treinamento aeróbio foi subdividido em 3 níveis: *Endurance* fácil (END1), moderado (END2) e Intenso (END 3). O treinamento na intensidade de END 1 compreendeu exercícios contínuos com duração alvo de 60 minutos e realizados em intensidades de 80% do LM. Foram classificados como séries de END2, os nados contínuos realizados na intensidade correspondente ao LM com duração alvo de 30 minutos. Os estímulos de END3 envolveram nados intervalados com duração de 5 minutos e 1 minuto de recuperação, totalizando 15 minutos de exercício com intensidades a 120% do LM adaptado de Maglisho (1999). Os treinamentos com o objetivo de desenvolver a aptidão anaeróbia (ANA) tiveram esforços intervalados com duração de 1

minuto e pausa de 3 minutos, com intensidades entre 220 a 260% do LM, totalizando 5 minutos de esforço.

Desse modo, a carga semanal total de treinamento (CST) correspondeu à somatória dos estímulos de treinamento obtida pelo produto do tempo de esforço (t) e a intensidade relativa (%) ao LM (Equação 1).

$$\text{CST} = (t_1 \cdot \%LM) + (t_2 \cdot \%LM) + (t_3 \cdot \%LM) + \dots$$

Equação 1. Determinação da carga semanal total de treinamento apresentada em unidades arbitrárias (UA). *Adaptado de Mujika et al. (1995).*

Treinamento Periodizado

O treinamento periodizado (GP) apresentou duração total de 12 semanas, sendo dividido em período preparatório básico (PPB), específico (PPE) e polimento (PP).

O PPB teve a duração de seis semanas sendo composto por estímulos intercalados de END1, END2, END3 e um tempo médio de exercício de 45 min diários. No PPE a duração foi de quatro semanas e meia com o tempo médio de nado reduzido em 31%, enquanto que a intensidade foi incrementada em 43% devido aos esforços realizados na intensidade de ANA. Após essas duas fases, os animais realizaram o PP, com duração total de uma semana e meia, caracterizado pela diminuição progressiva e não linear de 69% no volume e de 22% na intensidade em relação aos PPB e PPE, respectivamente (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1. Organização do treinamento utilizando as intensidades (END1, END2, END3 e ANA) ao longo de 12 semanas de treinamento periodizado.

SEMANAS	Seg	Ter	Qua	Qui	Sex	Sab	FASES
1	<i>TESTE</i>	END2	END1	END2	END1	END2	PPB
2	END2	END1	END2	END1	END2	END1	PPB
3	END2	END1	END3	END1	END2	END1	PPB
4	END2	END3	END1	END1	END2	END3	PPB
5	END2	END3	END1	END1	END2	END3	PPB
6	END3	END2	END1	ANA	OFF	<i>TESTE</i>	PPB
7	END2	ANA	END1	END3	END1	ANA	PPE
8	END2	ANA	END1	END3	END1	ANA	PPE
9	END2	ANA	END1	ANA	END1	ANA	PPE
10	END2	ANA	END1	ANA	END1	ANA	PPE
11	END2	ANA	OFF	<i>TESTE</i>	END2	END3	PPE/ PP
12	END2	ANA	END1	END3	OFF	<i>TESTE</i>	PP

OFF= Sem Treino

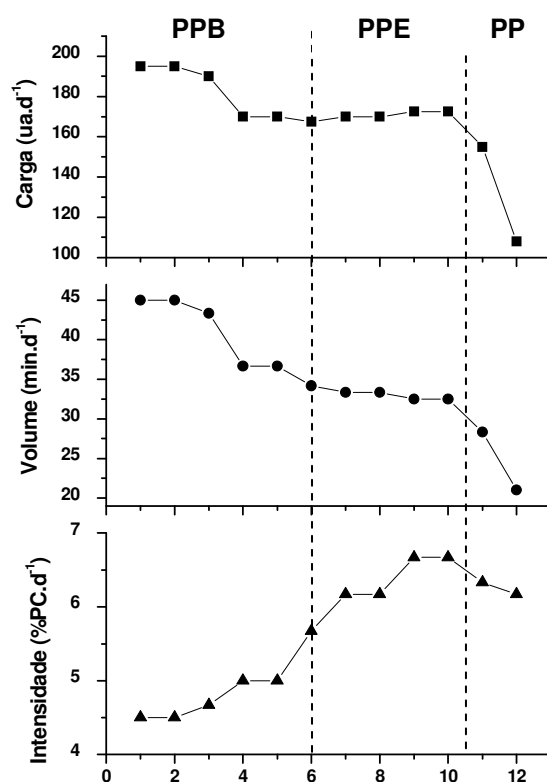
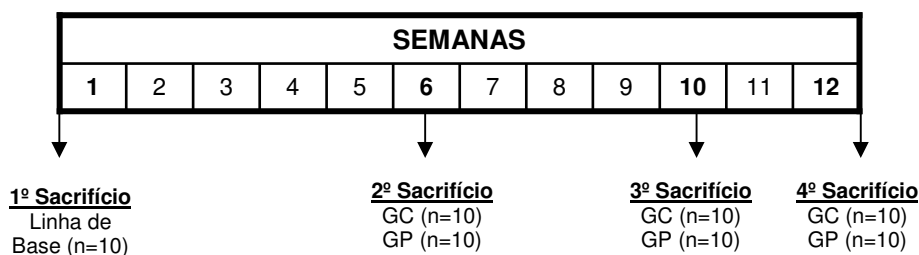


Figura 2. Comportamento teórico das variáveis, volume, intensidade e carga durante os períodos preparatório básico (PPB), específico (PPE) e polimento (PP) ao longo da periodização.

Desenho Experimental e análises bioquímicas

Dez ratos de cada grupo (GC e GP) foram sacrificados após a adaptação, ao início de cada período da periodização e ao final do período de polimento para determinação dos parâmetros bioquímicos, musculares, hepáticos e de *performance* aeróbia e anaeróbia (Esquema 1).



Esquema 1. Dias de sacrifício (eutanásia) ao longo do treinamento nos protocolos experimentais (GC e GP) no início do experimento e após 6; 10,5 e 12 semanas de treinamento. Os sacrifícios foram realizados 24 h após a última sessão de treinamento.

Determinação dos parâmetros sanguíneos e teciduais

Lactato: Coletas sanguíneas de 25µL foram diluídas em 50µL de fluoreto de sódio a 1% para análise eletroquímica em lactímetro YSI 1500 Sport.

Creatina Quinase: Kit "MPR3 CK NAC-ativado" (Boehringer Mannheim). O cálculo da concentração de CK (U/L) na amostra foi determinado pela equação $CK_p = 8252 \times \Delta$ absorvância/minuto.

Glicogênio Muscular e Hepático: Os tecidos foram extraídos e a coloração dos precipitados foi realizada segundo Dubois *et al.* (1956).

Tratamento Estatístico

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. A normalidade e a homogeneidade dos dados foram confirmados com os testes de Shapiro-Wilk's W test. Para os valores dos parâmetros determinados ao longo das fases da periodização foi utilizada a análise de variância ANOVA One-Way e quando necessário teste post-hoc de Newman Keuls. A comparação entre os protocolos de treinamento dos GP e GC foi realizada pelo teste paramétrico t student para amostras independentes (Statística 7.0[®]). O nível de significância foi pré-fixado em $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores médios de peso corporal mensurados no início (I) de cada período de treinamento e ao final (F) do PP estão expressos na tabela 2.

Tabela 2. Valores de peso corporal (g) em todas as fases da periodização nos grupos controle (GC) e periodizado (GP).

	GC	GP
IPPB (Linha de Base)	314,1 ± 4,3	317,1 ± 3,3
IPPE	382,8 ± 9,4 ^a	392,8 ± 9,3 ^a
IPP	441,2 ± 9,0 ^{a,b}	399,3 ± 16,2 ^{a,b}
FPP	459,1 ± 26,3 ^{a,b,c}	418,4 ± 16,6 ^{a,b,c}

^a Diferença significativa em relação ao IPPB.

^b Diferença significativa em relação ao IPPE.

^c Diferença significativa em relação ao IPP.

Respostas das variáveis volume e intensidade

O volume de treinamento foi determinado como a somatória total do tempo de esforço para cada intensidade. Não foram verificadas diferenças no volume (min) de treinamento nas intensidades de END1, END2, END3 e ANA do GP com o tempo alvo (Figura 3).

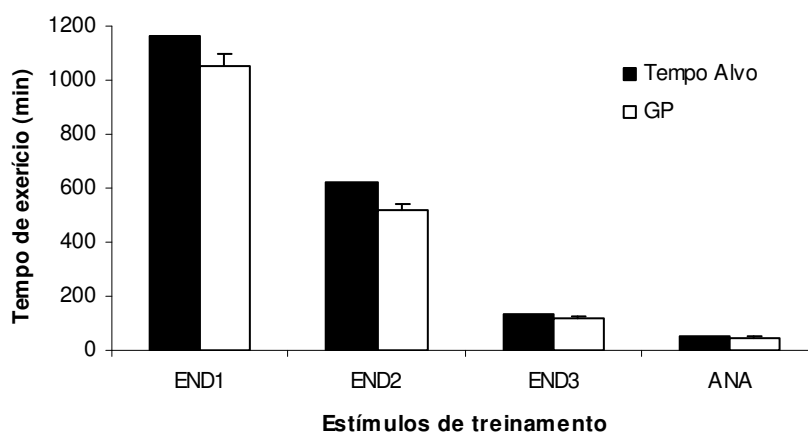


Figura 3. Somatória do tempo (min) total de exercício durante 12 semanas em cada intensidade de treinamento (END1, END2, END3 e ANA) realizadas pelo grupo periodizado (GP).

Performances aeróbia e anaeróbia (Lactato Mínimo e Tempo Limite) e Concentração Pico de Lactato

Doze semanas de treinamento periodizado não modificou o LM do GP, além disso, esses valores não foram diferentes do GC (Figura 4A). Já o tempo limite (Tlim) do GP apresentou diferenças significativas com relação ao GC no início (I) do PPE e IPP. Os valores de Tlim do GP ao final (F) do PP foram significativamente superiores aos verificados no GC bem como em relação ao IPPB e IPPE. O Tlim do GC não foi modificado ao longo da periodização experimental (Figura 4B).

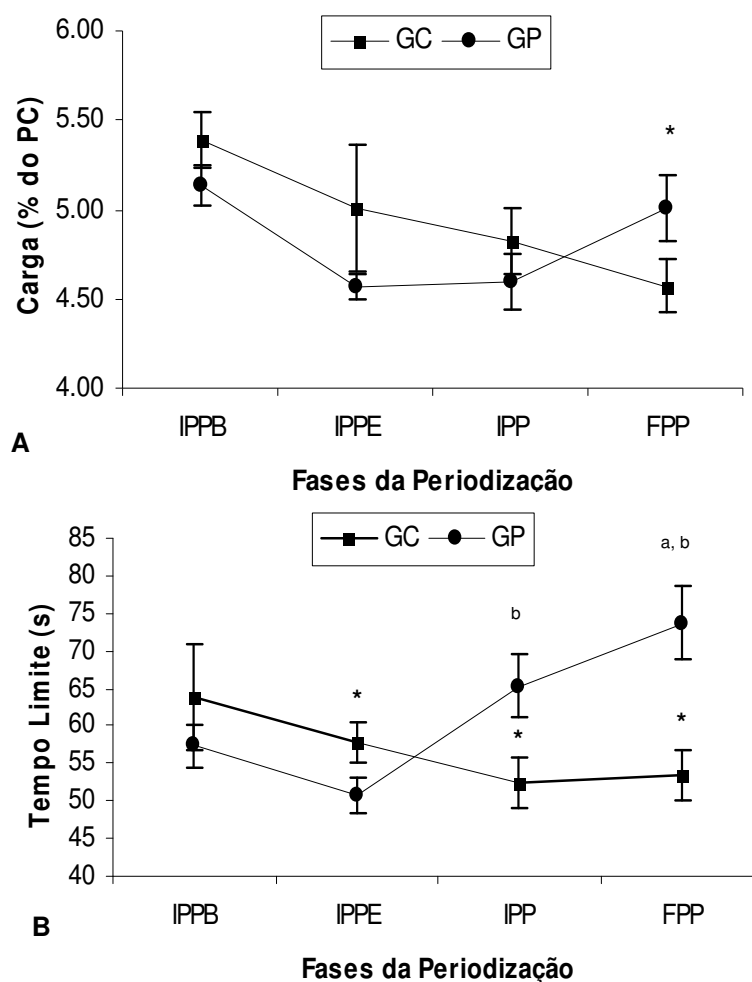


Figura 4. Valores de Lactato Mínimo (A - % do PC) e tempo limite (B - s) dos grupos controle (GC) e periodizado (GP) durante o início dos períodos preparatório básico (IPPB), específico (IPPE), polimento (IPP) e final do período de polimento (FPP). * Diferença significativa em relação ao GP. ^a Diferença significativa em relação ao IPPB. ^b Diferença significativa em relação ao IPPE. ^c Diferença significativa em relação ao IPP.

A concentração pico de lactato não apresentou diferenças significativas entre os grupos GC e GP. Em relação ao comportamento desse metabólito ao longo das fases da periodização, foi constatado que para o GP os valores apresentados nos IPPE, IPP e FPP foram significativamente superiores aos obtidos no IPPB. Além disso, os valores ao FPP foram significativamente superiores ao IPPE. Para o GC as concentrações pico de lactato nas fases IPPE, IPP e FPP foram significativamente superiores às observadas no início da periodização (IPPB) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de concentração pico de lactato (mmol.L^{-1}) ao final do teste de *performance* anaeróbia em todas as fases da periodização nos grupos controle (GC) e periodizado (GP).

	GC	GP
IPPB (Linha de Base)	5,48 ± 1,37 [*]	6,65 ± 0,95
IPPE	8,69 ± 0,68 ^a	7,49 ± 1,42 ^a
IPP	8,25 ± 1,18 ^a	8,26 ± 1,15 ^a
FPP	9,13 ± 0,84 ^a	8,89 ± 1,05 ^{a, b}

* Diferença significativa em relação ao GP.

^a Diferença significativa em relação ao IPPB.

^b Diferença significativa em relação ao IPPE.

3.3 Concentração de glicogênio muscular (sóleo e gastrocnêmio) e hepático

A concentração de glicogênio do gastrocnêmio no GP reduziu no IPPE em relação aos outros períodos. Apesar disso, o glicogênio do gastrocnêmio aumentou no IPP atingindo valores significativamente superiores no FPP (Figura 5A).

Diferentemente, no músculo sóleo os valores de glicogênio obtidos no GP não foram modificados ao longo da periodização, porém, foram maiores que o GC no FPP (Figura 5B). Em relação ao GC, as concentrações de glicogênio do músculo gastrocnêmio e sóleo não

foram diferentes em nenhuma das fases da periodização, apresentando valores significativamente reduzidos no FPP em relação ao GP (Figura 5A-B). As concentrações hepáticas de glicogênio no GP nas fases IPP e FPP foram maiores com relação ao IPPE. Além disso, no IPPE as concentrações hepáticas de glicogênio diminuíram significativamente em relação ao GC que se manteve com valores próximos nos IPP e FPP (Figura 5C).

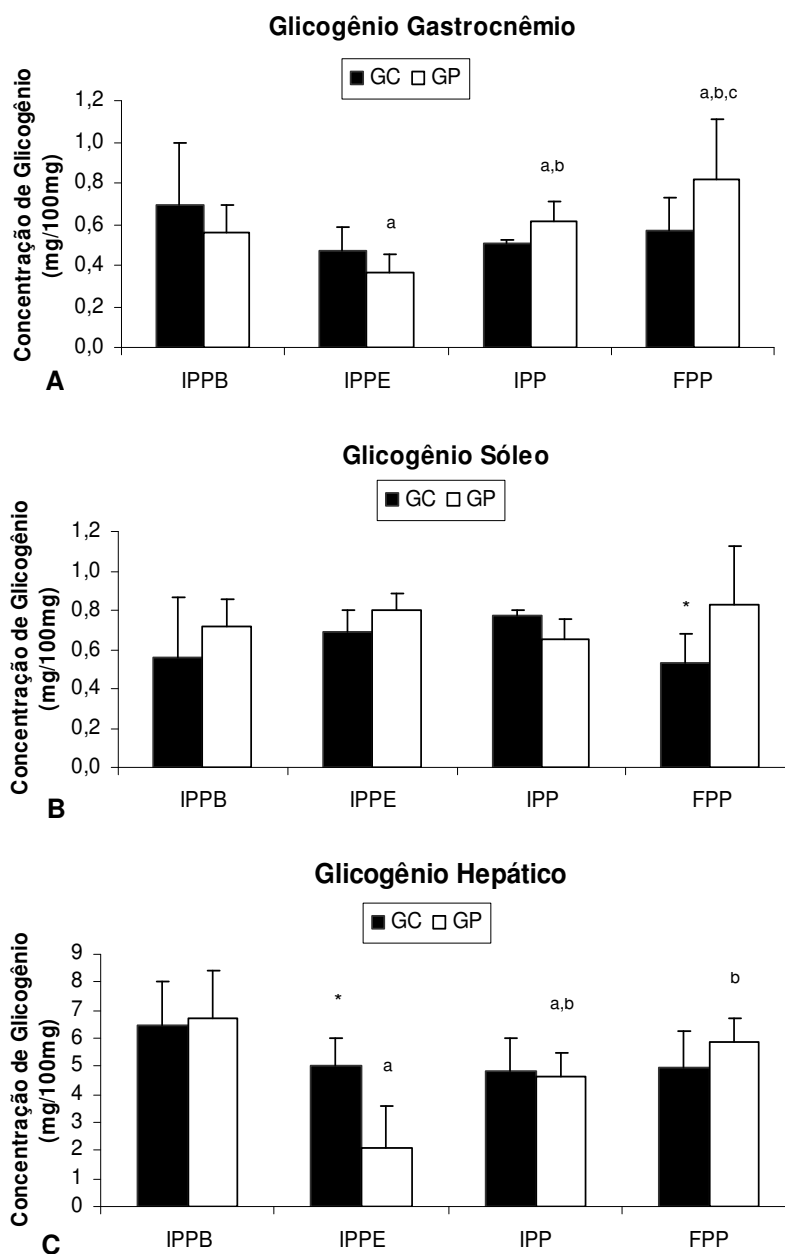


Figura 5. Concentração de Glicogênio Muscular dos músculos gastrocnêmio (A), sóleo (B) e do tecido hepático (C) nos períodos IPPB, IPPE, IPP e FPP.

* Diferença significativa em relação ao GP no mesmo período.

^a Diferença significativa em relação ao IPPB.

^b Diferença significativa em relação ao IPPE.

^c Diferença significativa em relação ao IPP.

Creatina Quinase (CK)

Não foram verificadas diferenças ao longo da periodização nos valores séricos de CK nem mesmo entre os GP e GC (Figura 6).

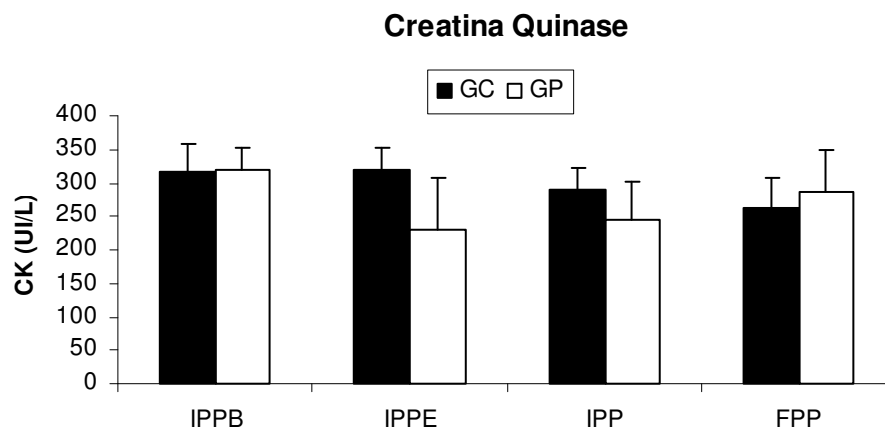


Figura 6. Valores absolutos de CK (U/L) ao longo da periodização nos diferentes períodos.

DISCUSSÃO

O modelo de periodização do treinamento padronizado para ratos no presente estudo foi baseado no modelo clássico semelhante ao proposto por Matveev (1996,1997) para humanos. A distribuição dos estímulos mensurados pelo volume de treinamento foi reproduzível em todas as intensidades da periodização experimental (Figura 2).

Os treinamentos na intensidade de END1 objetivaram a restauração parcial dos teores de glicogênio intramuscular, sendo as sessões de END1 realizadas principalmente após séries de esforços intensos, como anteriormente sugerido na literatura (Martin et al., 1998; Baldari et al., 2005). Entre as séries utilizadas para desenvolvimento da capacidade aeróbia, o treinamento na intensidade correspondente ao limiar anaeróbio (END2) possibilitou manter a mais alta concentração de lactato sem proporcionar acúmulo progressivo da lactacidemia ao longo da sessão. As séries END3 foram intensidades acima do limiar anaeróbio aplicadas com objetivo de desenvolver a potência aeróbia. Os estímulos em ANA objetivaram desenvolver a

capacidade anaeróbia com treinamentos intensos suportando períodos com alta produção de lactato (Maglischo, 1999).

Apesar das taxas de depleção e restauração dos estoques de glicogênio para cada intensidade não terem sido mensuradas, é provável que os estímulos de treinamento tenham alcançado suas finalidades demonstradas principalmente pelas diferentes concentrações desse polímero em resposta as diferentes características de cada período de treinamento (Figura 4).

O tempo de nado até a exaustão (Tlim), que foi assumido no presente estudo como parâmetro de *performance* anaeróbia, foi significativamente alterado ao longo das fases do treinamento especialmente no IPP, que foi o período de treinamento no qual estiveram contidos os estímulos de treinamento mais intensos, bem como as maiores concentrações de glicogênio. A redução do Tlim após o PPB pode ter ocorrido devido ao elevado volume de treinamento aeróbio que, por sua vez, pode levar à estagnação e comprometimento do desempenho anaeróbio refletido no presente estudo com a redução da oferta glicolítica de energia e diminuição do Tlim no IPPE (Costill, et al.,1991). Além disso, Fitts et al. (1989) relataram significativas reduções de 15% nas fibras musculares do tipo IIa de nadadores após 10 dias de treinamento com elevado volume. Em concordância, Taylor et al. (1999) constataram que as maiores adaptações metabólicas provenientes do treinamento aeróbio foram reguladas por mudanças moleculares específicas, como o aumento no conteúdo de mioglobina, triglicéride intramuscular e da lipoproteína lipase.

Desse modo, o esperado seria que a capacidade aeróbia determinada pelo LM sofresse aumentos significativos ao longo da periodização, principalmente após o período de elevado volume de treinamento aeróbio (PPB). No entanto, não foram observadas diferenças na resposta aeróbia ao longo do treinamento (Figura 3A). Carter et al. (1999), demonstraram que o teste de LM não é válido para determinar os efeitos do treinamento em humanos devido a sua reduzida sensibilidade aos ganhos aeróbios, sugerindo que outros protocolos de avaliação

possam ser mais precisos. Por outro lado Voltarelli et al. (2004) encontraram, após 4 e 8 semanas de treinamento de *endurance* em natação, positivas modificações na capacidade aeróbia de ratos determinada pelo teste de LM. No presente estudo, a queda da capacidade aeróbia ao longo do tempo parece ser um processo natural da espécie, porém, o treinamento periodizado mesmo não melhorando o LM atenuou essa redução em relação ao GC.

A concentração pico de lactato foi utilizada como indicador da capacidade produtora de lactato ao longo do treinamento. As maiores diferenças foram observadas a partir do IPPE em ambos os grupos, quando comparados ao IPPB. Contudo, a capacidade produtora de lactato do GC também aumentou significativamente após esse período, descartando assim a hipótese de alterações em função do treinamento. Medbo et al. (2001) demonstraram que a concentração sanguínea de lactato não reflete a produção energética real oriunda do glicogênio muscular. No entanto, outros pesquisadores verificaram que a formação de lactato pode estar relacionada à taxa de depleção energética pelo glicogênio muscular (Brooks et al., 1985; Shulman et al., 2005), podendo inclusive ser utilizado ao longo do treinamento como marcador de supertreinamento (Snyder et al., 1995; Halson et al., 2004). No presente estudo, devido à produção de lactato ter aumentado em ambos os grupos, uma justificativa para esse efeito seria que o aumento da lactacidemia após as seis semanas iniciais de treinamento tenha simplesmente ocorrido em função do desenvolvimento maturacional da espécie e/ou aumento do peso corporal total, ocasionando um aumento da massa muscular e conseqüentemente uma maior capacidade de produção lactacidêmica natural (Lodder et al., 1994).

A CK é uma enzima amplamente utilizada como biomarcador de estresse e alteração na atividade muscular. A elevação sérica da CK é atribuída a danos teciduais, podendo resultar num aumento na permeabilidade da membrana celular, entre outros fatores, devido à peroxidação lipídica (Zoppi et al., 2003; Halson et al., 2004). Tem sido verificado que as concentrações circulantes de CK são alteradas conforme as mudanças nas variáveis volume e

intensidade de treinamento (Yamamoto et al., 1988; Flynn et al., 1994). No entanto, o período de polimento é a principal fase na qual há melhor recuperação muscular diminuindo os valores séricos dessa enzima em relação aos outros períodos (Houmard, 1990; Mujika et al., 2004). No presente estudo, não foi constatadas variações significativas nas concentrações séricas dessa enzima ao longo das fases da periodização nos GP e GC (Janssen et al., 1986; Kanter et al. 1988). Essa resposta sugere que a manipulação das variáveis volume e intensidade ao longo das 12 semanas de periodização não resultou em lesão tecidual significativa, corroborando com estudos que demonstram que o treinamento periodizado além de maximizar a *performance* no momento desejado, também proporciona a diminuição dos riscos de supertreinamento (Kirwan et al., 1988; Stone, 1990; Fry et al., 1992; Flynn et al. 1994; Rowbottom, 2003).

O polimento é o final do período de treinamento que antecede a competição alvo (Mujika et al., 2003; Papoti et al., 2007). No presente estudo simulamos esse período da periodização em animais. Segundo a literatura, nesse período a carga de treinamento é reduzida, proporcionando recuperação fisiológica e psicológica do atleta na tentativa de promover aumento do rendimento no momento desejado (Mujika et al., 2004). No entanto, não se sabe qual o modelo ideal de polimento a ser aplicado, existindo divergências literárias a respeito dos métodos a serem utilizados (Neary et al., 2003; Luc & Busso, 2005). No presente estudo, o polimento teve redução de aproximadamente 69% no volume e 22% na intensidade desencadeando o processo de supercompensação dos substratos energéticos demonstrado com as maiores concentrações de glicogênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio bem como maiores valores no Tempo de exaustão (Tlim) caracterizando maior *performance* aeróbia e anaeróbia dos animais.

Dessa maneira, os resultados obtidos demonstraram que o modelo de periodização do treinamento na fisiologia experimental pode ser aplicado de maneira similar à executada em

humanos. Cabe ressaltar que o modelo proposto pode ser capaz de equacionar dúvidas provenientes da aplicação da periodização em esporte de alto rendimento, devido à possibilidade de maior controle extrínseco bem como manipulações invasivas nesses animais. A supercompensação dos substratos energéticos bem como a manutenção da capacidade aeróbia e aumento do tempo de exaustão ao final do período do polimento reflete a sensibilidade do treinamento aos estímulos aplicados e o sucesso na obtenção do pico de *performance* em um modelo experimental de treinamento periodizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. Fry RW, Morton AR, Garcia-Webb P, Crawford GPM, Keast D. Biological responses to overload training in endurance sports. *Eur J Appl Physiol.* 1992, 64: 335-44.
2. Rowbottom DG. Periodização do treinamento. In: Garret Jr, WE, Kirkendall, DT. A ciência do exercício e dos esportes. *Artmed.* 531, 2003.
3. Mujika I, Chatard JC, Busso T, Geysant A, Barale F, Lacoste L. Effects of Training on Performance in Competitive Swimming. *Can J Appl Physiol.* 1995, 20:395-406.
4. Martin DE, Coe PN. Developing running with periodization of training. Champaign, Human Kinetics. 1997: 167-252.
5. Kramer WJ, Nindl BC, Ratamess NA, Gotshalk LA, Volek JS, Fleck SJ, Newton RU and Hakkinen K. Changes in muscle hypertrophy in women with periodized resistance training. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36(4):697-708.
6. Mujika I, Padilla S. Scientific bases for precompetition tapering strategies. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(7):1182-7.
7. Thomas L, Busso T. A theoretical study of taper characteristics to optimize performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(9):1615-21.

8. Matveev LP. Treino Desportivo: Metodologia e Planejamento. Phorte, São Paulo, 1997.
9. Bompa TO. Periodização: Teoria e Metodologia do Treinamento. Editora, São Paulo, 1999.
10. Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;130(1):21-7.
11. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of aerobic threshold in rats rising the lactate minimum test. *Braz J Med Biol*. 2002, 35(11): 1389-1394.
12. Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello, MAR. Maximal lactate steady state in running rats. *J Exercise Physiol*. online, 2005, 8: 29-35.
13. deAraujo GG, Papoti M, Manchado FB, Mello MAR, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A, Mol Integr. Physiol*. 2007; 148(4):888-92.
14. Contarteze RV, Manchado FB, Gobatto CA, Mello MA. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008;151(3):415-22.
15. Tegtbur U, Busse MW., Braumann KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci in Sports Exercise*. 1993, 25, 5, 620-627.
16. Maglisho EW. Nadando Ainda Mais Rápido. São Paulo: Manole, 1999.
17. Dubois B, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*. 1956; 28:350-356.

18. Baldari C, Videira M, Madeira F, Sergio J, Guidetti L. Blood lactate removal during recovery at various intensities below the individual anaerobic threshold in triathletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005;45(4):460-6.
19. Costill DL, Thomas R, Robergs RA, Pascoe D, Lambert C, Barr S, Fink WJ. Adaptations to swimming training: influence of training volume. *Med Sci Sports Exerc*. 23:371-377, 1991.
20. Fitts RH, Costill DL, Gardetto PR. Effect of swim exercise training on human muscle fiber function. *J Appl Physiol*. 1989;66(1):465-75.
21. Carter H, Jones AM, Doust JH. Effect of 6 weeks of endurance training on the lactate minimum speed. *J Sports Sci*. 1999;17(12):957-67.
22. Voltarelli FA, Mello MAR, Gobatto CA. Limiar Anaeróbio determinado pelo Teste do Lactato Mínimo em Ratos: Efeito dos Estoques de Glicogênio Muscular e do Treinamento Físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*. 2004; 4(3), 16-25.
23. Medbø JJ, Toska K. Lactate release, concentration in blood, and apparent distribution volume after intense bicycling. *Jpn J Physiol*. 2001;51(3):303-12.
24. Halson S, Jeukendrup A. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med*. 2004; 34(14):967-81.
25. Shulman RG. Glycogen turnover forms lactate during exercise. *Exerc Sport Sci Rev*. 2005;33(4):157-62.
26. Lodder MA, de Haan A, Sargeant AJ. Effect of growth on efficiency and fatigue in extensor digitorum longus muscle of the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1994;69(5):429-34.
27. Mujika I, Padilla S, Pyne D, Busso T. Physiological changes associated with the pre-event taper in athletes. *Sports Med*. 2004;34 (13):891-927.

28. Kanter MM, Lesmes GR, Kaminsky LA, La Ham-Saeger J, Nequin ND. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1988;57(1):60-3.
29. Papoti M, Martins LE, Cunha SA, Zagatto AM, Gobatto CA. Effects of taper on swimming force and swimmer performance after an experimental ten-week training program. *J Strength Cond Res*. 2007;21(2):538-42.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

10.4 APÊNDICE 4

Araujo GG, Papoti M, Manchado- Gobatto, Mello MAR, Gobatto CA. EFFECTS OF ENDURANCE MONOTONOUS TRAINING IN RATS SUBMITTED TO SWIMMING EXERCISE.

ABSTRACT

Purpose: The objective of this study was to determine in rats the effects of endurance monotonous training on anaerobic and aerobic performance, creatine kinase, muscle and liver glycogen. **Methods:** Twenty six male Wistar rats (*Rattus Norvegicus*), 60 days old, were selected and separated in two groups, exercise (EG n=10) and control (CG n=16). Eight rats of CG were sacrificed before and the remaining (n=8) after the experimental period. The EG was submitted to monotonous training (1h/day, 6 day/wk, 12 wk). The training intensity was constant and equivalent to 100% of aerobic capacity determined by minimum lactate test (ML). Creatine Kinase (CK), soleus glycogen, gastrocnemius glycogen, liver glycogen and anaerobic-aerobic performance (ML) were evaluated before and after 12 wk of experimental period. **Results:** The volume of training reduced significantly in comparison to the initial wk. The CK (U/L) increased in EG after 12 wk (742.0 ± 475.6) in comparison the CG in initial phase (319.6 ± 120.7) and CG after 12 wk (261.6 ± 126.7) of experimental period. Muscle and liver glycogen increased after training but aerobic and anaerobic performance did not improve after 12 wk. **Conclusion:** Endurance monotonous training led to changes related to overtraining and reduced the volume training and did not improve the anaerobic and aerobic performance.

Key Words: BIOMARKERS; GLYCOGEN; LACTATE; PERFORMANCE.

INTRODUCTION

The inappropriate volume and intensity of the training sessions can exceed the individual tolerance to the exercise and the athlete's recovery, promoting the overtraining (Fry et al., 1992; Foster, 1998; Zoppi and Macedo, 2008). Overtraining is a state that several physiological and psychological disorders happen affect mainly athletes (Nicholls et al., 2009). Therefore, the intensified training and inappropriate periods of recovery can result in a decline of performance and it may be extended for week or months (Lehmann et al., 1992, 1993, 1998; Halson and Jeukendrup, 2004). Kuipers (1998) verified that a training program without changes in volume and intensity (monotonous) can unleash overtraining. However, Hooper et al. (1995) showed that an adequate alteration in volume and intensity such as periodized training reduces the athlete's chance to develop overtraining (Hedelin et al., 2000; Mackinnon, 2000). On the other hand, factors as excess of competition, monotonous training and nutrition predispose the athlete to overtraining (Foster, 1998; Zoppi and Macedo, 2008).

Currently, countless ways have been developed to detect the overtraining and many researchers make use of physiological variables to explain the overtraining effects on metabolism (Lehmann et al., 1992; Hooper et al., 1993, 1995; Urhausen et al., 1998; Hedelin et al., 2000). Among the physiological variables employed with this purpose, the most common analyses are muscle glycogen depletion, immune system state, serum hormones, serum glutamine, heart rate variability and serum creatine kinase (Snyder, 1998; Mackinnon, 2000; Halson and Jeukendrup, 2004; Hynynen et al., 2006).

Serum Creatine Kinase concentration (CK) is considered as a marker for detection muscle injury in exercise (Fry et al., 1992; Totsuka et al., 2002). As a consequence of the stress training (inappropriate regeneration periods and incorrect training loads) the muscle CK is released to the circulation increasing its levels in plasma. Also, it is possible that different types of training influence serum CK concentration and its evaluation may serve as tool that

reflects the state of training. However, CK evaluation is not accurate performance indicator and sometimes is insufficient to compare level of training with the demands of the athletic competition (Fry et al., 1992; Brancaio et al., 2007).

Inefficient program of training with limited recovery can decrease muscle glycogen concentration and delay muscle glycogen resynthesis decreasing the performance (Vandenbergh et al., 1995). However, the effect of glycogen metabolism on training is unclear due to innumerable pathways responsible to alter glycogen stores as genetic, muscle type fibers, nutrition, intensity, recovery and others factors (Costill et al., 1988). Nevertheless, the insertion of training models in experimental physiology becomes an important tool to simulate physical stress adaptations as observed in humans, aimed to a better understanding of the systemic and cellular adaptations to exercise. In experimental physiology, due to same strain and extrinsic factors (diet, environment, care and interventions), the responses to the exercise is more accurate and possible specific analyses not feasible in humans (Zoppi and Macedo, 2008).

In the present study, our hypothesis is that monotonous training promotes negative biomarkers adaptations as decreasing muscle glycogen concentration and performance variables and increasing serum CK concentration. Specifically, the purpose of this study was to examine the serum CK concentration and muscle glycogen (soleus and gastrocnemius) and liver glycogen concentrations after 12 wk of endurance monotonous training in swimming rats. Also, there were evaluated training volume and aerobic/anaerobic performances before and after 12 wk training.

METHODS

Animals

All experiments involving the animals were performed in accordance to the specific Brazilian resolutions on the Bioethics in Experiments with animals (law project no 93/08, approved in September 9th, 2008), that is in agreement to the guidelines of the American

Society of Physiology (ASP) for research involving animals and to the European Convention for the protection of vertebrate animals used for Experimental and other scientific purposes.

Twenty six male Wistar rats (*Rattus Norvegicus Albinus*), 60 days old, weighing 250-300g in the beginning of the experiment and 450-500g at the end were selected for this study. During the whole experiment, the animals received water and commercial chow (Labina-Purina®) *ad libitum* and were housed at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ with an inverted 12:12-h light-dark cycle (18:00-06:00 lights on). The swimming training was preceded by 2 wk of individual adaptation to the deep water environment consisting of 5-minute water ($31\pm 1^{\circ}\text{C}$) exposure daily, in cylindrical tanks (80 cm diameter \times 120 cm depth), subdivided into cylindrical compartments of 30 cm diameter \times 120 cm depth for individual swimming.

Experimental Groups

The animals were separated in two groups: exercise (EG, n=10) and control (CG, n=16). Eight rats of CG were sacrificed before experimental period (60 days, Base Line) and the remaining (n=8) after 12 wks (150 days). The EG (n=10) was sacrificed 24 hours after the last session of the training that lasted 12 wk (Figure 1).

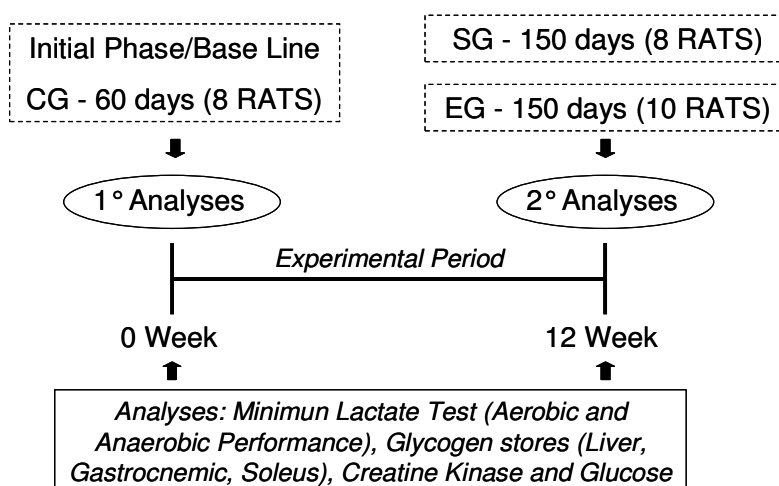


Figure 1. Experimental design and timeline for analyses in base line (control group – CG, n=8) at the initial phase (0 Week) and after experimental period (12 Week) in two groups: sedentary (SG, n=8) and trained (EG, n=10).

Minimum Lactate Test (ML)

For determination of the aerobic and anaerobic performances before and after 12 wk of experimental period, the minimum lactate test (ML) was utilized which enables the determination of the aerobic and anaerobic parameters in a single protocol (Tegtbur et al., 1993; Voltarelli et al., 2002). This test consists in a first phase of hyperlactatemia induction (anaerobic) followed by incremental swimming intensity. The hyperlactatemia phase consisted of two swim bouts supporting overload of 13% of body weight (bw), both separated by a 1 min passive recovery. The first bout consisted of 30 s of exercise and second bout until exhaustion that was assumed when the animal was unable to stay on the water surface by 15 s (second bout time - $T_{lim13\%}$ - anaerobic parameter) (deAraujo et al., 2007). After hyperlactatemia induction, the animals were maintained shallow water to avoid thermal stress and blood samples from acut at the tail were collected at 7 and 9 minutes for lactate peak determination. The incremental phase of the test involved swimming with tethered loads (backpack lead) equivalent to 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, and 7.0% individual bw. The stages in each load lasted 5 min and were separated by 30s for blood collection and lactatemia determination. The ML intensity (aerobic) was obtained from the equal zero derived of the

second order polynomial fit for the lowest lactate value of the “U-shaped” curve of blood lactate concentration versus load of the incremental phase of the ML test (Figure 2). The lowest level in this curve theoretically represents the maximal exercise load in which the lactate production rate is the same as the lactate removal rate, i.e. it corresponds to the maximal lactate steady state, which is considered as the gold standard test in the aerobic capacity determination (deAraujo et al., 2007).

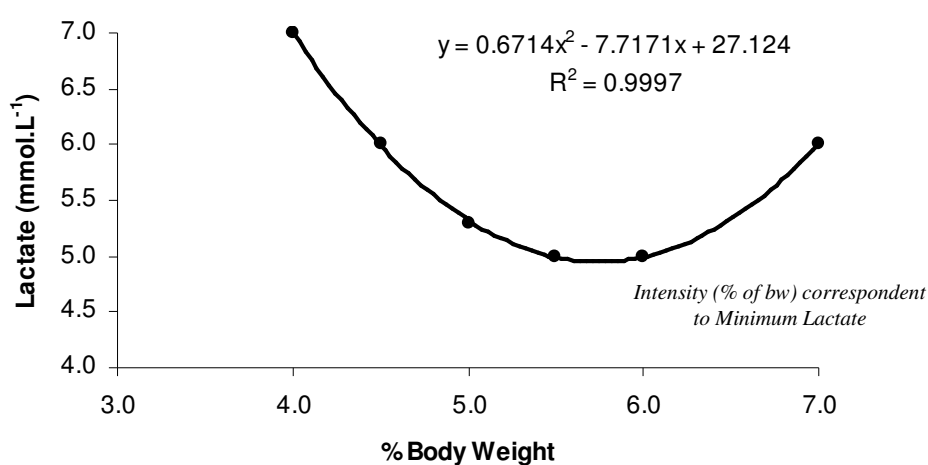


Figure 2. Example (experimental rat) of minimum lactate test. The lactatemia in incremental phase of the test was similar for all rats and involved swimming with loads of 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, and 7.0% of body weight (bw) for 5 min in each one. The stages were separated by 30 s for blood collection and lactatemia

Training

The training protocol lasted 12 wk with exercise sessions of 1 h/day, 6 days/wk. The intensity of the training (% of body weight) was constant and based individually by the ML test (deAraujo et al., 2007) (Table 1).

Table 1. Training Protocol

TRAINING PROTOCOL					
Intensity (% of Body Weight)	Frequency (Days/Wk)	Session (Time/Day)	Volume of Session (min)	Recovery between sessions (hours)	Total Duration (Wk)
Constant (Monotonous) – Determined by minimum lactate test	6	1	60	24	12

This intensity of training was re-calculated weekly based on weighing of each rats. The amount of training in minutes was quantified in each training session. The rats that did not complete the session training were timed and registered (min) (Equation).

$$\text{Week Volume (min)} = \sum \text{daily minutes} / 6 \text{ days}$$

The criteria used to insure the animals indeed exhausted during session training, was considered the point at which all coordinated movements ceased and the animal could no longer return to the surface in 15 s (McArdle and Montoye, 1966).

Biochemical Analyses

Lactate. For determination of the lactate concentrations, blood samples (25 μL) were collected from rats' tail distal extremity, using of heparinized capillary tubes. Samples were transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes containing 50 μL of sodium fluoride (1%). The blood samples were stored in freezer (- 20° C) during 1 wk and lactate concentration was analyzed with an electrochemical analyzer (YSI 1500 Sport[®]).

Glucose and Creatine Kinase. Blood was collected by a cardiac puncture after thoracotomy, 24 h after the end of the performance tests. The rats were anesthetized (Ketamine/Xylazine) and 2 mL of blood samples were collected for the glucose and creatine kinase analyses. Each blood sample without anticoagulant was centrifuged (5 min at 3500g). The supernatant were stored in freezer (- 20° C) during 1 wk for duplicate analysis. The levels of serum glucose were determined using glucose-oxidase colorimetric enzymatic method kit (14). The serum CK concentration was analyzed by "MPR3 CK NAC-active" kit (Boehringer Mannheim[®]).

Glycogen Stores. Gastrocnemius, soleus and liver tissues were carefully dissected and maintained at -80°C until further analysis. At the time of analysis, all tissues were rapidly

thawed, minced into small pieces and homogenized with KOH 30%. The analyses of glycogen continued according to Dubois (1956).

Statistical Analyses

According to the Shapiro–Wilk’s W-test, data presented normal distribution and the homogeneity was confirmed by the Levene’s test. Therefore, the analysis of variance (ANOVA one-way) with Newman–Keuls’ post hoc test was used for averages comparisons. The statistical significance was set at $P < 0.05$, and all data are presented as mean \pm standard deviation.

RESULTS

The mean of the volume training measured every week (Σ daily minutes/ 6 days) was reduced significantly after 7 wk (Figure 3).

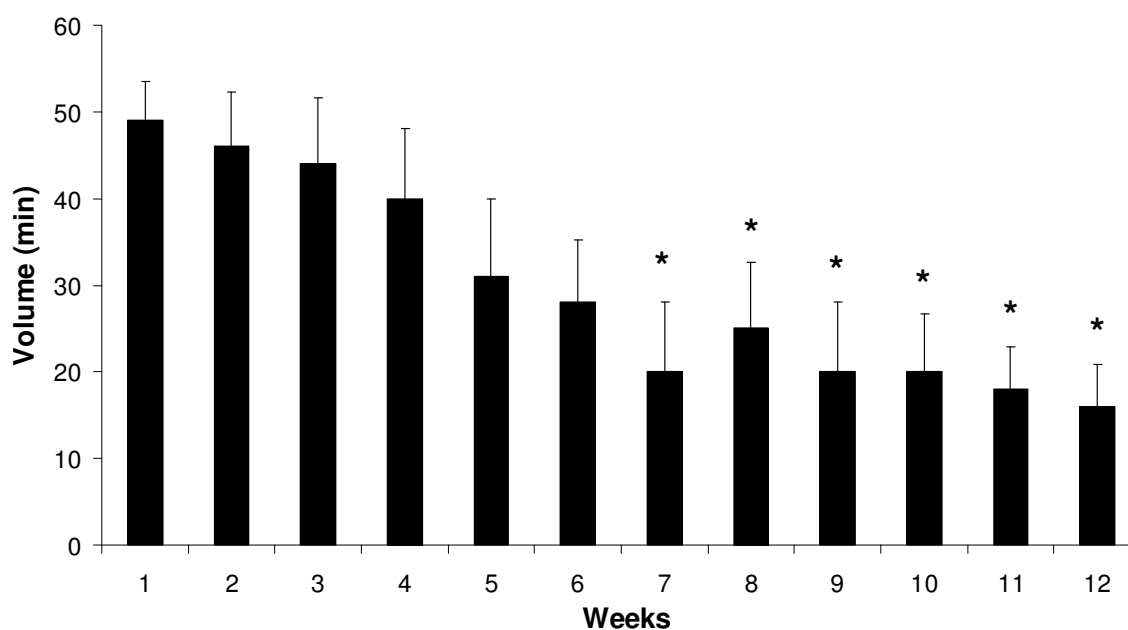


Figure 3. Values of the volume trained (min) along 12 wk. * Reduce in relation 1, 2, 3, 4 wk ($P < 0.05$).

The aerobic capacity measured by ML test was not altered after 12 wk of endurance training but decreased in sedentary group (SG) (Table 2). The anaerobic parameter

determined by Tlim (13% of bw) was reduced after training to EG in relation to the initial CG values.

Table 2. Lactate minimum load (ML -% of body weight) determined from zero derived polynomial fit curves, Tlim13% (s) obtained at hyperlactatemia induction phase and blood lactate concentration verified after the anaerobic induction (Peak).

	CG (n= 8) 0 Week	SG (n=8) 12 Week	EG (n=10) 12 Week
Aerobic Capacity – LM (% of bw)	5.30 ± 0.50	4.56 ± 0.26*	5.34 ± 0.90 [#]
Δ% in relation SG 12 Week	14		15
Anaerobic Capacity – Tlim 13% bw (s)	61 ± 14	53 ± 8	45 ± 11*
Δ% in relation SG 12 Week	14		-16
Blood Lactate after Tlim13% (mmol.L⁻¹)	6.92	9.13*	9.34*

* Significant differences (p<0.05) in relation to CG.

[#] Significant differences (p<0.05) in relation to SG.

The CK concentration was higher after endurance training (EG) than CG and SG after experimental period (Figure 4).

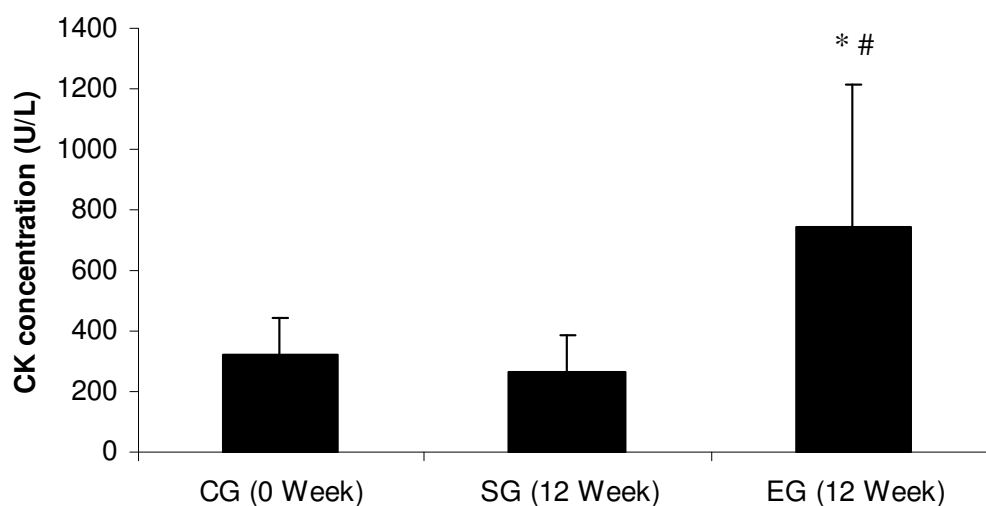


Figure 4. Changes in Creatine Kinase concentration (CK) during experimental period.

* Significant differences (p<0.05) in relation to CG.

[#] Significant differences (p<0.05) in relation to SG.

Table 3 shows that glycogen concentration (liver and gastrocnemic muscle) after 12 wk of endurance training had remarkable differences. Soleus muscle glycogen concentration after 12 wk of training (EG) was 37% higher than initial phase (CG). The serum glucose was not changed with training (CG vs EG) but this parameter in SG was higher than EG and CG (Table 3).

Table 3. Values of glycogen concentration (mg/100mg) of the tissues liver, gastrocnemic muscle, soleus muscle and glucose concentration (mg/dL) during experimental period in the groups CG and EG.

	CG (n= 8) 0 Week	SG (n=8) 12 Week	EG (n=10) 12 Week
Liver	5.662 ± 1.397	5.529 ± 0.106	7.592 ± 0.625* [#]
Gastrocnemic	0.445 ± 0.106	0.430 ± 0.055	0.802 ± 0.104* [#]
Soleus	0.433 ± 0.122	0.414 ± 0.051	0.595 ± 0.161* [#]
Serum Glucose	107.306 ± 15.075	148.333 ± 16.887*	120.417 ± 15.577 [#]

* Significant differences (p<0.05) in relation to CG.

[#] Significant differences (p<0.05) in relation to SG.

DISCUSSION

Among the techniques used for development the endurance capacity, training prescription at anaerobic threshold intensity (ML) is one of the most adequate, keeping over time without blood lactate accumulation (deAraujo et al., 2007). In present study, the ML test was applied to identify aerobic and anaerobic performances as well as to prescribe individualized training overload (deAraujo et al., 2007). Even in controlled aerobic intensities (ML), our results foment the hypothesis that endurance monotonous training could predispose changes related to overtraining as inability of the rats to endure exercise volume, not glycogen utilization during exercise, maintenance of aerobic performance and elevation of serum CK concentration.

Curiously, energetic supercompensation in EG (liver and muscle glycogen stores) were not used and mobilized to maintain volume and improve anaerobic (Tlim) and aerobic (ML) performances (Vandenbergh et al., 1995; Snyder et al., 1995; Snyder, 1998). Even

without to analyse directly the glycogen depletion (acute exercise group or glycolytic enzymes), the similar peak lactate concentrations associated to similar Tlim (s) between SG and EG, showed an inefficiency of EG to mobilize the glycogen stores and convert to lactate production (Costill et al., 1991).

Possibly, the endurance monotonous training promotes constant physiological responses (predominant utilization of muscle type I) and energetic demand (fat oxidation and translation of oxidative enzymes) inhibiting enzymatic (glycolytic) and endocrine adaptations for glycogen cleavage in energy substrate (Lehmann et al., 1998; Kuipers, 1998, Urhausen et al., 1998; Meeusen et al., 2007). The long-period of aerobic training stimulates the glycogen synthesis but does not allow an efficient glycogenolysis and hyperlactatemia (Lehmann et al., 1992; Foster, 1998). Halson and Jeukendrup (2004) reported that fatigue and underperformance in the training series are at partially attributable to a decreased in muscle glycogen levels. Moreover, Costill (1988) reported that the glycogen levels do not alter the performance in swimmers but influence energy required during sessions training, resulting in fatigue and therefore reduction of the performance in next training session.

Analysing the training volume it is possible to verify that from the 7th wk started the intolerance to support the load of training owing the insistence in same load and duration. In definition, the overtraining is an accumulation of load training and stress with decrement in performance (Kuipers, 1998; Hartmann and Mester, 2000; Zoppi and Macedo, 2008). The volume intolerance associated to CK increases do not characterize overtraining but shows some adaptations related since CK concentration was elevated after training (EG) in relation to SG and CG, this factor accounting for damages on muscle due to inadequate cell recovery (Flynn et al., 1994).

However, the most surprising results were observed in the aerobic and anaerobic performances. Reduction of Tlim in EG was expected due to high training volume that leads

to reduction anaerobic characteristics as type II muscle fibers and glycolytic enzymes (Costill et al., 1991). On the other hand, it was expected an increase of the aerobic performance from endurance training due to aerobic adaptations as myoglobin content, intramuscular triglyceride and lipoprotein lipase (Taylor and Bachman, 1999). Therefore, the first possibility for aerobic capacity unaltered was based that ML test was not sensitive to examine aerobic benefits of the training in humans (Carter et al., 1999). However, this theory was revised due the ML in rats increased after 8 wk of swimming training (Voltarelli et al., 2004). Another suggestion for unaltered ML after training is that long experimental period (3 months), results in older rats, decreasing the natural physical fitness (SG) (Trappe et al., 1996; Lambertucci et al., 2007). Also, the physical training attenuated this natural fall in EG and our results have showed that, as well as in humans, the training program in rats should have variation in volume/intensity/recovery to meet the cellular time necessary for adaptation in next training as well as stimulated other energetic systems to improve the performance (Foster, 1998; Meeusen et al., 2007).

In conclusion, the endurance monotonous training promoted changes in biomarkers related to elevated CK concentration, reduced training volume and maintenance of the aerobic performance as well as supposed poor utilization of energetic substrates during exercise. However, other specifics/molecular analyses are necessary to evidence the adaptations and responsible ways that promote these adaptations during monotonous endurance training.

PERSPECTIVE

Studies on exercise physiology have increased the use of animal models to simulate the physical stress conditions frequently observed in humans, aimed to a better understanding of the systemic, cellular and molecular alterations in response to exercise (Voltarelli et al., 2002; deAraujo et al., 2007; Zoppi and Macedo, 2008). The exercise interventions on pathology/surgery, nutrition, analyze/technique laboratorial and others has been widely used

in physiology. Even when the objective of the study is not training model, we can not to neglect the effects of chronic exercise on organic adaptations. The present study showed that a badly elaborated training program may result in negative responses and may to influence even in clinical response. As well as in humans, not all training programs lead to positive results in rats. In humans, training program without changes in volume and intensity (monotonous) can unleash overtraining (Kuipers, 1998; Hedelin et al., 2000). Thus, from the standardization of exercise intensity in rats (anaerobic threshold) and association with human's model training, the prescription of training for these animals in all areas should be based on individualized assessment protocols avoiding inadequate responses.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FAPESP (04/01205-6; 06/58411-2) for the financial support.

REFERENCES

- Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull* 2007;81-82: 209-30.
- Carter H, Jones AM, Doust JH. Effect of 6 weeks of endurance training on the lactate minimum speed. *J Sports Sci* 1999;17: 957-67.
- Costill DL, Flynn MG, Kirwan JP, Houmard JA, Mitchell JB, Thomas R, Park SH. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20:249-54.
- Costill DL, Thomas R, Robergs RA, Pascoe D, Lambert C, Barr S, Fink WJ. Adaptations to swimming training: influence of training volume. *Med Sci Sports Exerc* 1991;23:371-7.
- deAraujo GG, Papoti M, Manchado FB, Mello MA, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A, Mol Integr Physiol* 2007; 148: 888-92.

Dubois B, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 1956; 28: 350–356.

Flynn MG, Pizza FX, Boone JRBJ, Abdres FF, Michaud TA, Rodrigues-Zayas JR. Indices of training Stress During Competitive Running and Swimming Seasons. *Int J Sports Med* 1994;15:21-26.

Foster C. Monitoring training in athletes with reference to overtraining syndrome. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30(7):1164-8.

Fry RW, Morton AR, Garcia-Webb P, Crawford GP, Keast D. Biological responses to overload training in endurance sports. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1992;64: 335-44.

Halson SL, Jeukendrup AE. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med* 2004;34: 967-81.

Hartmann U, Mester J. Training and overtraining markers in selected sport events. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 209-15.

Hedelin R, Kentta G, Wilklund U, Wiklund U, Bjerle P, Henriksson-Larsén K. Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 1480–84.

Henry RJ, Cannon DC, Winkelman J. *Clinical chemistry, principles and techniques*, 2a ed. Harper & Row Publishers Inc., New York. 1974: 1288.

Hooper SL, Mackinnon LT, Howard A. Physiological and psychometric variables for monitoring recovery during tapering for major competition. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31: 1205-10.

Hooper SL, Mackinnon LT. Monitoring overtraining in athletes. Recommendations. *Sports Med* 1995;20: 321-7.

Hooper, SL, Mackinnon LT, Gordon RD, Bachmann AW. Hormonal responses of elite swimmers to overtraining. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25: 741–7.

- Hynynen E, Uusitalo A, Konttinen N, Rusko H. Heart rate variability during night sleep and awakening in overtrained athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38: 313-7.
- Kuipers H. Training and overtraining: an introduction. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30:1137-9.
- Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, Pithon-Curi TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev* 2007; 128: 267-75.
- Lehmann M, Foster C, Dickhuth HH, Gastmann U. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 1140-5.
- Lehmann M, Foster C, Keul J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25(7):854-62.
- Lehmann M, Gastmann U, Petersen KG, Bachl N, Seidel A, Khalaf AN, Fischer S, Keul J. Training-overtraining: performance, and hormone levels, after a defined increase in training volume versus intensity in experienced middle- and long-distance runners. *Br J Sports Med* 1992; 26: 233-42.
- Mackinnon LT, Hooper SL, Jones S, Gordon RD, Bachmann AW. Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29: 1637-45.
- Mackinnon LT, Hooper SL. Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during intensified training in swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 1996; 28: 285-90.
- MacKinnon LT. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunol Cell Biol* 2000; 78:502-9.
- Meeusen R, Watson P, Hasegawa H, Roelands B, Piacentini MF. Brain neurotransmitters in fatigue and overtraining *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32:857-64.

- Nicholls AR, Backhouse SH, Polman RC, McKenna. Stressors and affective states among professional rugby union players *Scand J Med Sci Sports* 2009;19:121-8.
- Pichot V, Busso T, Roche F, Garet M, Costes F, Duverney D, Lacour JR, Barthélémy JC. Autonomic adaptations to intensive and overload training periods: a laboratory study *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34:1660-6.
- Snyder AC, Kuipers H, Cheng B, Servais R, Franssen E. Overtraining following intensified training with normal muscle glycogen *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 1063-70.
- Snyder AC. Overtraining and glycogen depletion hypothesis *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 1146-50.
- Taylor AW, Bachman L. The effects of endurance training on muscle fibre types and enzyme activities *Can J Appl Physiol* 1999; 24: 41-53.
- Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25: 620-7.
- Totsuka M, Nakaji S, Suzuki K, Sugawara K, Sato K. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise *J Appl Physiol* 2002; 93: 1280-6.
- Trappe SW, Costill DL, Vukovich MD, Jones J, Melham T. Aging among elite distance runners: a 22-yr longitudinal study *J Appl Physiol* 1996; 80: 285-90.
- Urhausen A, Gabriel HH, Kindermann W. Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 407-14.
- Urhausen A, Gabriel HH, Kindermann W. Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 407-14.
- Vandenbergh K, Hespel P, Vanden Eynde B, Lysens R, Richter EA. No effect of glycogen level on glycogen metabolism during high intensity exercise *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 1278-83.

Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1389-94.

Voltarelli FA, Mello MAR, Gobatto CA. Anaerobic Threshold analyzed by lactate minimum test in rats: effects of muscle glycogen and training *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto, Cidade do Porto, Portugal* 2004; 4: 16-25.

Zoppi CC, Macedo DV. Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation *Scand J Med Sci Sports* 2008;18: 67-76.

10.5 APÊNDICE 5

Araujo GG, Papoti M, Reis IGM, Mello MAR, Gobatto CA. EFFECTS OF LINEAR PERIODIZATION TRAINING ON GLYCOGEN STORES, BIOMARKERS AND PERFORMANCE OF RATS.

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to examine the performance and biomarkers after each mesocycle of linear periodized training (LPT – 12 week) in Wistar rats after basic period, specific period and taper period. All experiments were preceded by 2 weeks of individual adaptation to the water. The TPG has been carried through during a period of 12 weeks (w) with frequency of 6 days/w. The training period was subdivided in three specialized series blocks: Preparation (6 w), Specific (4.5 w) and Taper (1.5 w). The Lactate Minimum Test (LACm) was adapted to determine the aerobic capacity. The anaerobic performance was evaluated by maximal exhaustion time (Tlim) verified during hyperlactatemia induction phase in the LACm protocol. Stimulus of the training was based in corresponding intensities to the LACm: Endurance (END) 1= 60%; END2= 100%; END3= 120% and Anaerobic (ANA) 240% of the LACm. Anova Two-way and Newman-Keuls post-hoc test ($P < 0.05$). The real volume of the training obtained in LPT was not different in relation to the estimated volume. The Tlim obtained in LPT after 6 and 12 week was higher than respective period in CT group but unchanged during mesocycles. The aerobic performance in LPT remained higher than CT. The CK concentrations reduced in relation to baseline after the 12 weeks and the Catalase after taper decreased in LPT in relation to CT 12 week. In conclusion, the linear oscillation between volume and intensity was based on studies with humans and therefore, the rats performed the training stimulus. Also, the aerobic performance in CT decreased after experimental period but the training periodization attenuated this natural aerobic fall. So, the LPT to rats showed an important tool to evaluate specific effects of training and avoid negative biomarkers adaptations.

INTRODUCTION

With the proposal of division seasonal training into smaller periods, scientists, coaches and athletes seek the best handling among volume/intensity/recovery to reach the higher performance at the end of the macrocycles (Matveev, 1986; Franco et al., 2004; Issurin, 2008). Currently, many researches show ways to reach the best adaptations and performance through training programs (Issurin, 2008; Kok et al., 2009). However, the comparisons among training investigations are limited due to distinct nationalities, performance level, sports modality and culture (Fry et al., 1992).

Therefore, experimental training models using laboratory rats is an important tool to identify precisely the physiological effects and exercise adaptations. Experimental training avoids the influence of extrinsic factors through the control of diet and environment (stress, sleep) as well as genetic using animals of same strain. Also, from the determination of intensity (protocols of exercise evaluation) and the detection of overtraining (biomarkers) in rats, it is possible to investigate and simulate precisely the training models in laboratory (Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2006; Hohl et al., 2009). Thereby, studies involving different training protocols are needed to elucidate many points in the experimental physiology related to high performance (Buford et al., 2009; Hoffman et al., 2009).

Our hypothesis is that the linear periodized training in rats can improve aerobic-anaerobic performances after macrocycle as well as prevent symptoms of overtraining. Therefore, the purpose of this investigation was to examine performance and overtraining biomarkers after each mesocycle of linear periodized training (12 week). Specially, to evaluate aerobic and anaerobic performances by the lactate minimum test and investigate in glycogen stores (soleus, gastrocnemius and liver), hormone concentrations (testosterone and corticosterone), enzymes (creatine kinase, lactate dehydrogenase, catalase and superoxide

dismutase) and metabolites (urea, uric acid and creatinine) of Wistar rats after basic period, specific period and taper period of training.

METHODS

Animals

All experiments involving the animals were performed in accordance to the specific Brazilian resolutions on the Bioethics in Experiments with animals (law project no 93/08, approved in September 9th, 2008), that is in agreement to the guidelines of the American Society of Physiology (ASP) for research involving animals and to the European Convention for the protection of vertebrate animals used for Experimental and other scientific purposes.

Seventy male *rattus norvegicus albinus* (*Wistar*), 60 days old, weighing 250-300g in the beginning and 450-500g at the end of experimental period, provided from the central vivarium of the Sao Paulo State University campus of Botucatu were used. Through all the experiment the animals were kept in indoor environment, in collective polyethylene cages (maximum of 5 rats per cage), at environment temperature of 77° F and inverted photoperiod (light/dark) of 12/12 hours. The animals received commercial chow for rodents (Labina-Purina[®]) and water *ad libitum*. The experiment was preceded by 2 weeks of individual adaptation to the deep water consisting of 5-minute water exposure daily, 5 days a week in individual cylindrical tanks (80 cm diameter×120 cm depth), filled with water at 31±1 °C.

Experimental design

The rats (n=70) were divided into two groups: linear periodization training (LPT, n=30) and sedentary/control (CT, n=40). Ten animals of each group were sacrificed in rest, after each mesocycles and 24 hours after the last training session of LPT (Figure 1).

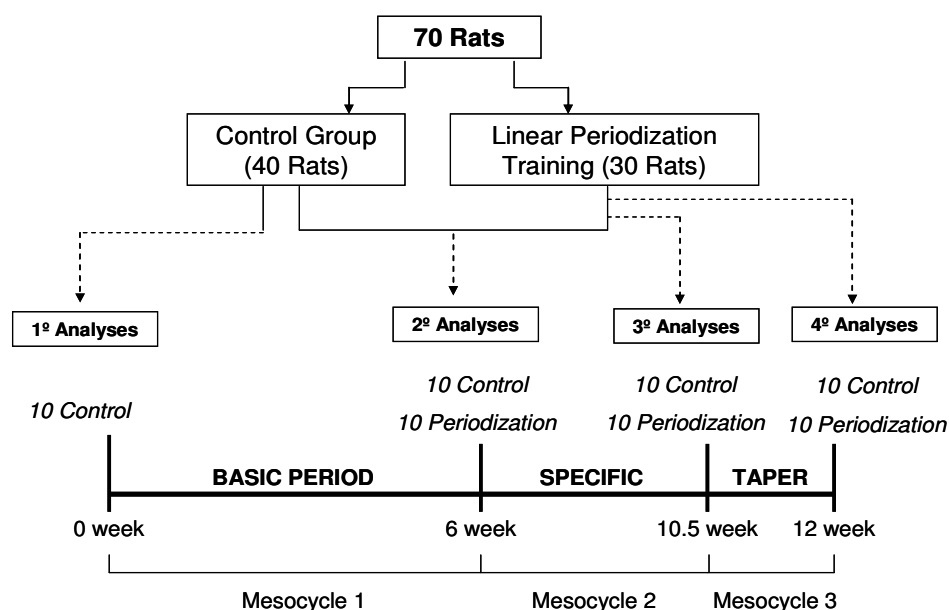


Figure 1. Timeline of analyses after mesocycles for control group (CT) and linear periodization training (LPT). Rats sacrificed for blood collection, muscle and tissues assays. The anaerobic and aerobic performances were measured in each period.

Linear Periodization Training (LPT)

The LPT lasted 12 week (macrocycle) with daily exercise sessions of 6 days/week. Macrocycle was divided in to 3 mesocycles (Figure 1). The load of training (volume x intensity) was based in the anaerobic threshold (AT) determined individually by the lactate minimum test adapted for rats (deAraujo et al., 2007). The AT workload was subdivided in 4 training intensities (3 aerobic and 1 anaerobic):

- Endurance 1 (END1). Equivalent to 60% of AT lasting 60 min;
- Endurance 2 (END2). Equivalent to 100% of AT lasting 30 min;
- Endurance 3 (END3). Equivalent to 120% of AT with 3 series of 5 min separated by 1 min of recovery;
- Anaerobic (ANA). Equivalent to 220-260% of AT with 5 series until exhaustion separated by 1 min of recovery.

The basic period (6 weeks) consisted mainly of END1 and END2. Specific period (4.5 weeks) consisted of END1, END2, END3 and ANA stimulus increasing the intensity (45%)

and reducing the volume (30%) in relation to the basic period. Taper period was characterized by a linear reduction in volume and intensity in relation to the specific period in the order of 47% and 12% respectively. The total load of training was the product between volume (min) and intensity (% of AT) (Figure 2).

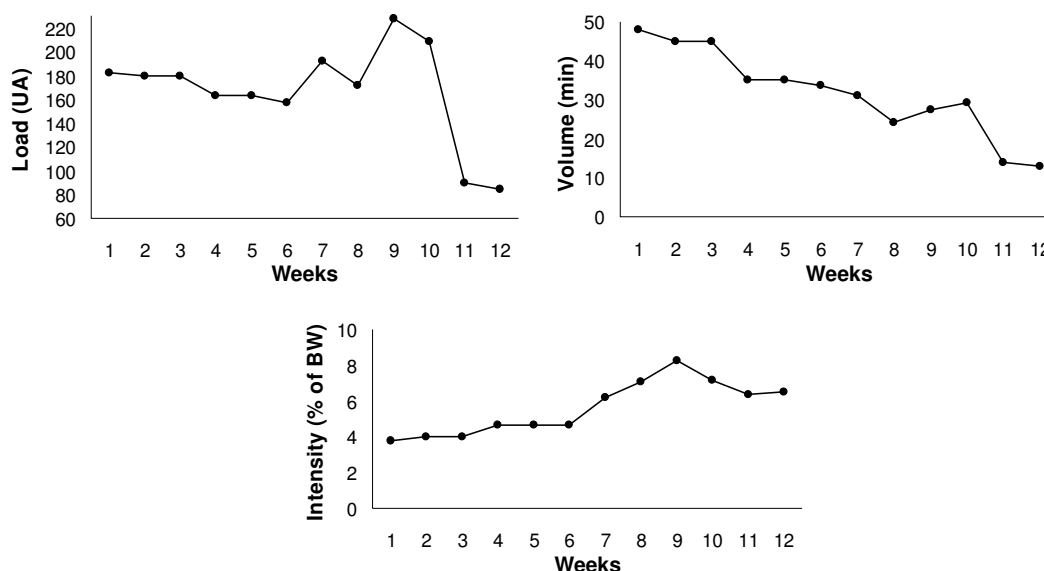


Figure 2. Distribution of volume and intensity during macrocycle. The load calculated by product of volume and intensity decreased in the taper period.

Performance assessment- Lactate Minimum Test

For assessment of aerobic and anaerobic performances before and after each mesocycle, the lactate minimum test (LM) which enables the determination of the aerobic and anaerobic parameters in a single protocol (Tegtbur et al., 1993; Voltarelli et al., 2002) was used. The test consists of performing an incremental exercise after acidosis induction (Exhaustion Time – T_{lim}). The LM consists initially of hyperlactatemia induction phase (13% of body weight – T_{lim}) followed by a 9-minutes recovery period followed by an incremental swimming exercise (de Araujo et. al, 2007). During recovery time, the animals were kept in shallow water to avoid thermal stress and blood samples were collected (tail) in the 7th and 9th minute for lactate peak determination. Each animal swan individually to exhaustion which was considered as that point at which all coordinated movements ceased and the animal could

no longer return to the surface (McArdle and Montoye, 1966). The incremental phase of the test consisted of swimming with loads of 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 and 6.5% of body weight (%BW) during stages of 5 minutes until exhaustion or completes the last stage. The stages were separated by 30s periods for blood samples collection from a small cut at the tip of the tail. The LM intensity was obtained from the equal zero derived of the second order polynomial fit for the lowest lactate value of the “U-shaped” curve of blood lactate concentration versus load of the incremental phase of the LM test (Figure 3) (deAraujo et al., 2007).

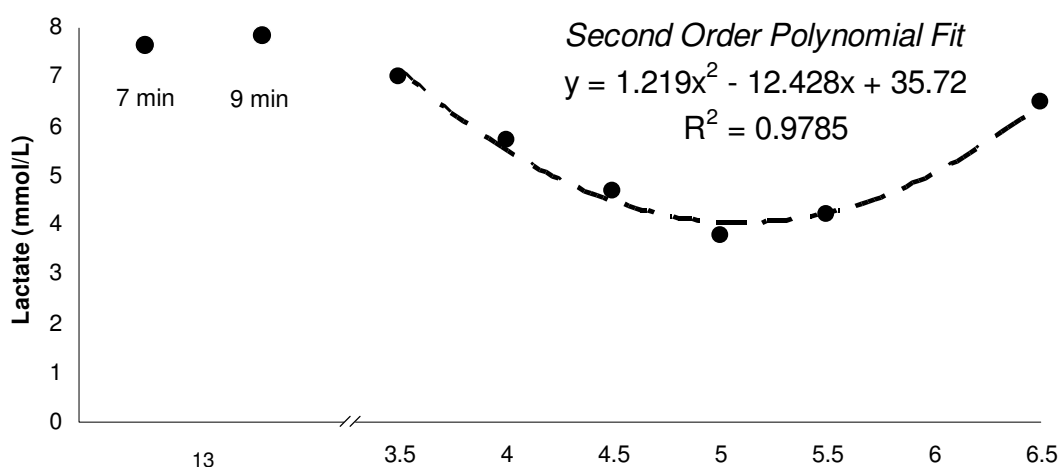


Figure 3. Example of lactate minimum test of a rat. The hyperlactatemia and incremental phase of the test was similar for all mesocycles with loads of 3.5, 4.0 4.5, 5.0, 5.5, and 6.5% of body weight (bw). The stages were separated by 30 s for blood collection and lactatemia determination.

Biochemical Analyses

Lactate Concentration. The blood samples (25 μ L) collected from the animals during exercise tests were placed in microtubes (1.5 mL) containing 50 μ L of 1% sodium fluoride which were stored in freezer for later lactate concentration analysis in YSI model 1500 SPORT lactate analyzer.

Glycogen Stores. White portion gastrocnemius muscle, soleus muscle and liver were excised, aimed at glycogen dosage (Dubois et al., 1956).

Enzymes and metabolites. The serum creatine kinase concentration, lactate dehydrogenase, creatinine, acid uric and urea were analyzed by commercial Kit from Boehringer Mannheim®.

Hormones. Concentration of Corticosterone (Kit -Coat-A-Count Kit from Diagnostic Products Corporation—DPC®) and testosterone (Cayman Chemical, Testosterone ELISA Kit®).

Sulfhydryl Groups, Catalase and Superoxide Dismutase. For sulfhydryl groups measurement, the plasma (50 µL) was mixed in 1 mL of Buffer Tris-EDTA for first spectrophotometer analyses (412 nm). After, 20 µl of 5.5-diotibis-2-nitrobenzoic (DTNB) 10 mM were added, diluted in methanol and was realized second spectrophotometer analyses. The blank sample contained DTNB and Buffer Tris-EDTA. The Total Sulfhydryl Groups was calculated (first -second-blank) x 1,57mM using molar absorbance= 13.600 cm⁻¹M⁻¹. Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD) activity (U/mL) were measured using an EIA Cayman Chemical Assay Kit®. The reagents kit (Buffer, Formaldehyde Standart, KOH, Methanol, hydrogen peroxide, potassium periodate) for CAT was mixed and spectrophotometer analyses at 540 nm. For SOD activity, was used xanthin and xanthin oxidase method. The absorbance was 460 nm.

Statistical Analyses

The dependent variables contained in all the steps were subjected to normality test using the W test of Shapiro-Wilk. For values obtained every periods and between training protocols (CG and LPT) analysis of variance Two-Way ANOVA was applied, followed when required by the post-hoc Newman Keuls test. For non-parametric samples, it was used the Kruskal-Wallis followed by Dunn's method. The statistical significance was set at P<0.05, and all data are presented as mean ± standard deviation.

RESULTS

The real volume of the training obtained in LPT was not different in relation to the estimated volume. However, the total area of volume obtained in LPT reached 93% in relation of the total area proposed (Figure 4).

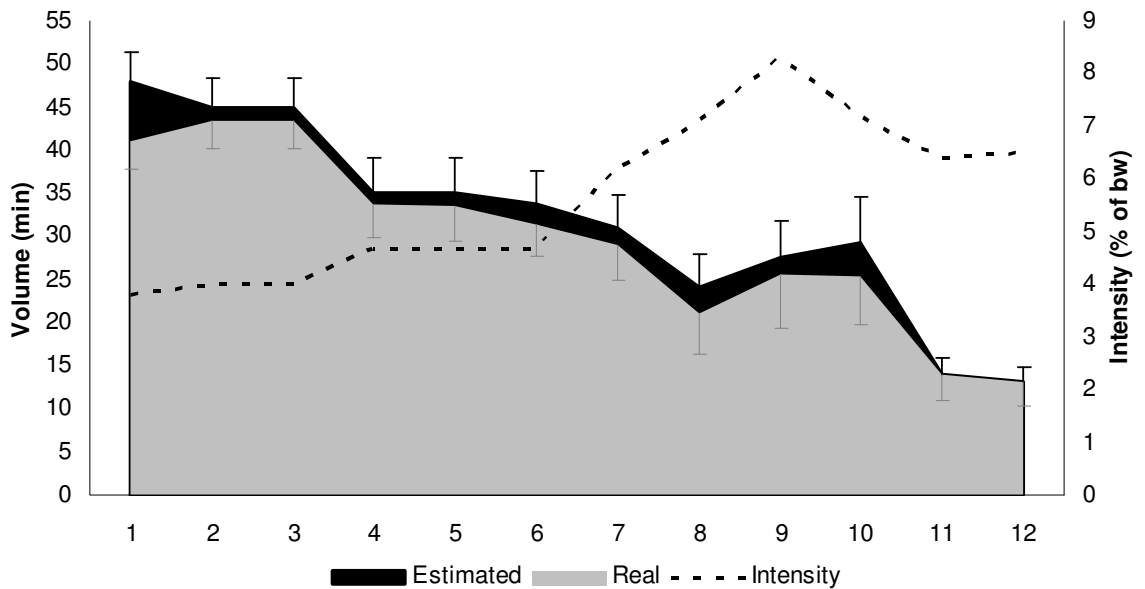


Figure 4. Volume (min) and Intensity (% of bw) estimated and real during 12 weeks of LPT. Total area= Estimated - Real.

Tlim obtained in LPT after 6 and 12 week was higher than respective period in CT group but unchanged during mesocycles. The Tlim in CT decreased 43%, 30% and 33% after 6, 10.5 and 12 week respectively in comparison 0 week (Figure 5).

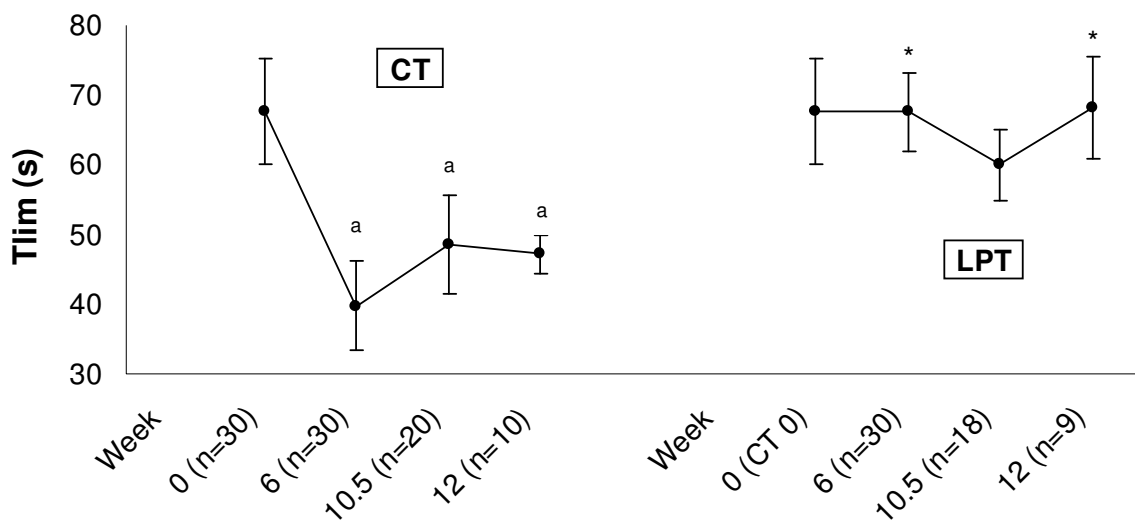


Figure 5. Exhaustion time (Tlim - s) at anaerobic intensity of 13% of bw during the hyperlactatemia phase of the lactate minimum test.

^a Significant differences (P<0.05) in relation to 0 week.

^{*} Significant differences (P<0.05) in relation to CT group in respective period.

The lactate production increased after hyperlactatemia phase in specific period (10.5 week) and taper (12 week) in relation 0 week for LPT group (Table 1).

Table 1. Peak Lactate (mmol/L) after hyperlactatemia phase in LM test after basic (6 week), specific (10.5 week) and taper (12 week) periods in CT and LPT group.

	0 Week	6 Week	10.5 Week	12 Week
CT		5.60 ± 0.47	6.30 ± 0.46	5.95 ± 0.56
	5.53 ± 0.38	(n=30)	(n=20)	(n=10)
LPT	(n=30)	6.12 ± 0.31	6.87 ± 0.44 ^{a b}	6.77 ± 0.25 ^a
		(n=30)	(n=18)	(n=9)

^a Significant differences (P<0.05) in relation to 0 week. ^b Significant differences (P<0.05) in relation to 6 week.

After 12 weeks of training, the aerobic capacity showed reduction in relation baseline for both groups. However, the aerobic performance in LPT remained higher than CT (Figure 6).

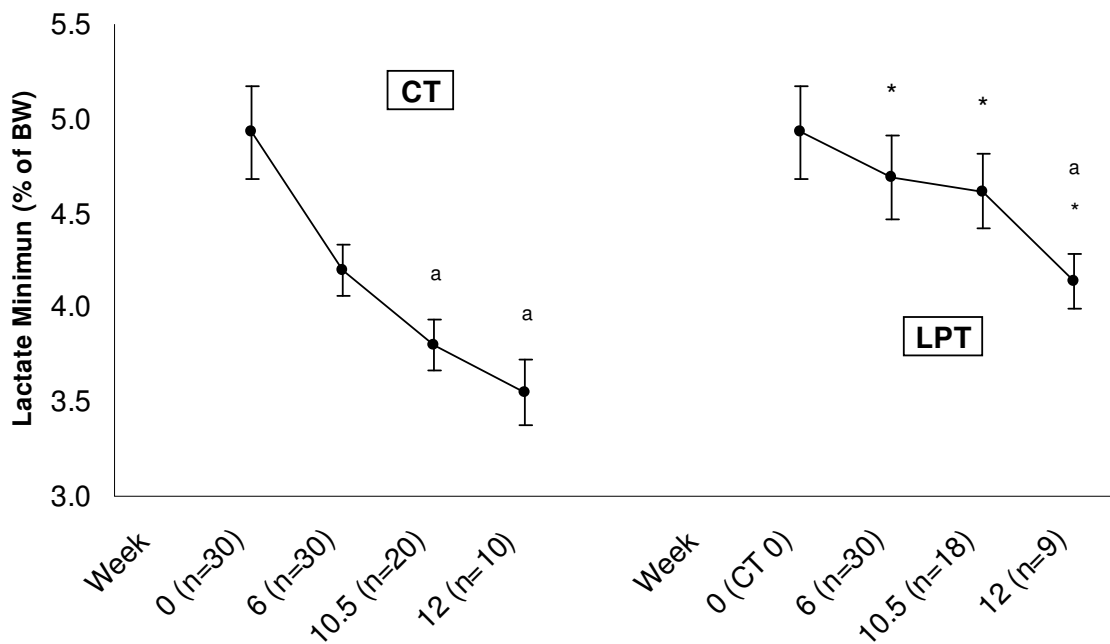


Figure 6. Aerobic capacity measured by Lactate minimum test in each mesocycle. The intensity of lactate minimum test was determined by % of the body weight (bw) in CT and LPT group.

^a Significant differences (P<0.05) in relation to 0 week.

* Significant differences (P<0.05) in relation to CT group in respective period.

Second order polynomial interpolation obtained by fitting lactate kinetic during the incremental phase of LM test during 12 weeks of training are presented in table 2. The success rate (%) in the determination of LM by polynomial fit (R^2 above 0.80) increased with training in LPT and reduced in CT (Table 2).

Table 2. Second order polynomial fit (R^2) in each LM test and the success rate (%) for each analyses in LPT and CT group.

	0 Week	6 Week	10.5 Week	12 Week
CT	(n=30)	(n=30)	(n=20)	(n=10)
R²	0.93 ± 0.04	0.99 ± 0.01	0.90 ± 0.14	0.99 ± 0.09
Success rate (%)	60	50	40	30
LPT	(n=30)	(n=30)	(n=18)	(n=9)
R²	0.93 ± 0.04	0.93 ± 0.06	0.92 ± 0.07	0.90 ± 0.09
Success rate (%)	60	70	78	89

Glycogen stores in gastrocnemius muscle increased similarly in both groups (CT and LPT) after 6, 10.5 and 12 weeks in relation 0 week. Also, no significant differences occurred in gastrocnemius glycogen concentration with training (Figure 7).

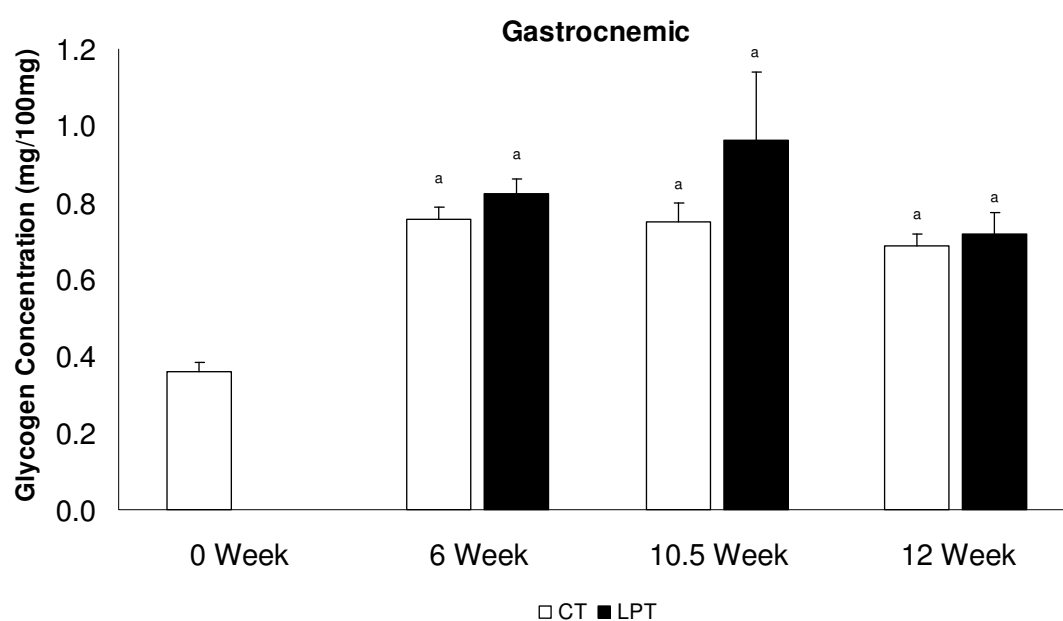


Figure 7. Values of glycogen concentration in white portion gastrocnemius muscle analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week (basic period), 10.5 week (specific period) and 12 week (taper).

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

CT 0 week (n=10), 6 week (n=10), 10.5 week (n=10) and 12 week (n=10).

LPT 6 week (n=10), 10.5 week (n=9) and 12 week (n=9).

The glycogen concentration in soleus increased after basic period (6 week) but reduced after specific (10.5 week) and taper (12 week). However, the glycogen stores in LPT were higher than CT after 10.5 weeks (Figure 8).

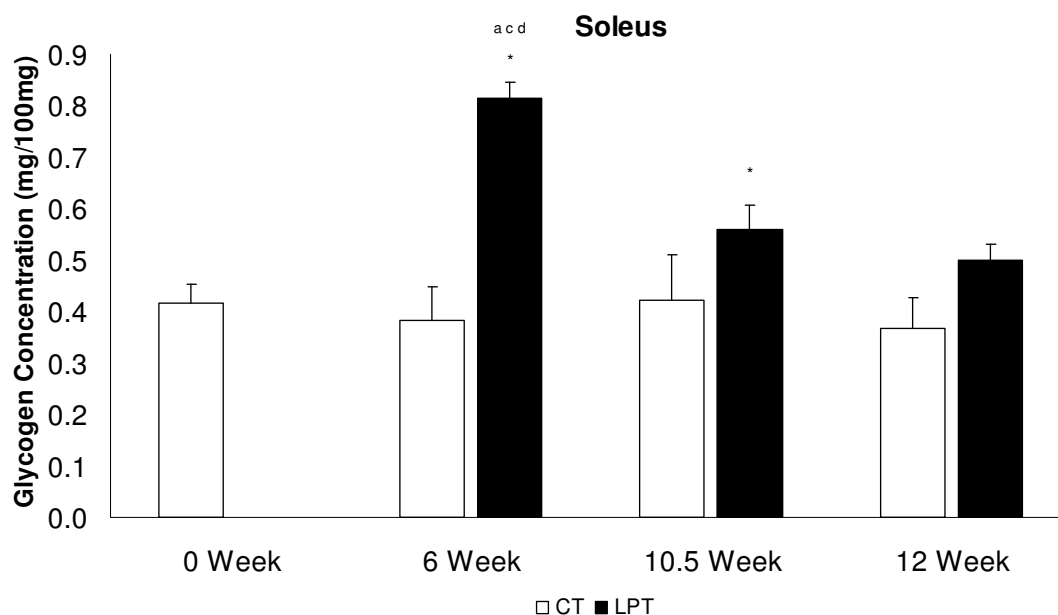


Figure 8. Values of glycogen concentration in soleus muscle analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week (basic period), 10.5 week (specific period) and 12 week (taper).

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

^c Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 10.5 week.

^d Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 12 week.

* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CT group in respective period.

CT 0 week (n=10), 6 week (n=10), 10.5 week (n=10) and 12 week (n=10).

LPT 6 week (n=10), 10.5 week (n=9) and 12 week (n=9).

Glycogen stores in the liver increased in LPT after taper period. However, the glycogen concentration in the liver reduced after 6 weeks in LPT group in relation CT group (Figure 9). Also, glycogen concentration increased in CT in relation baseline (Figure 9).

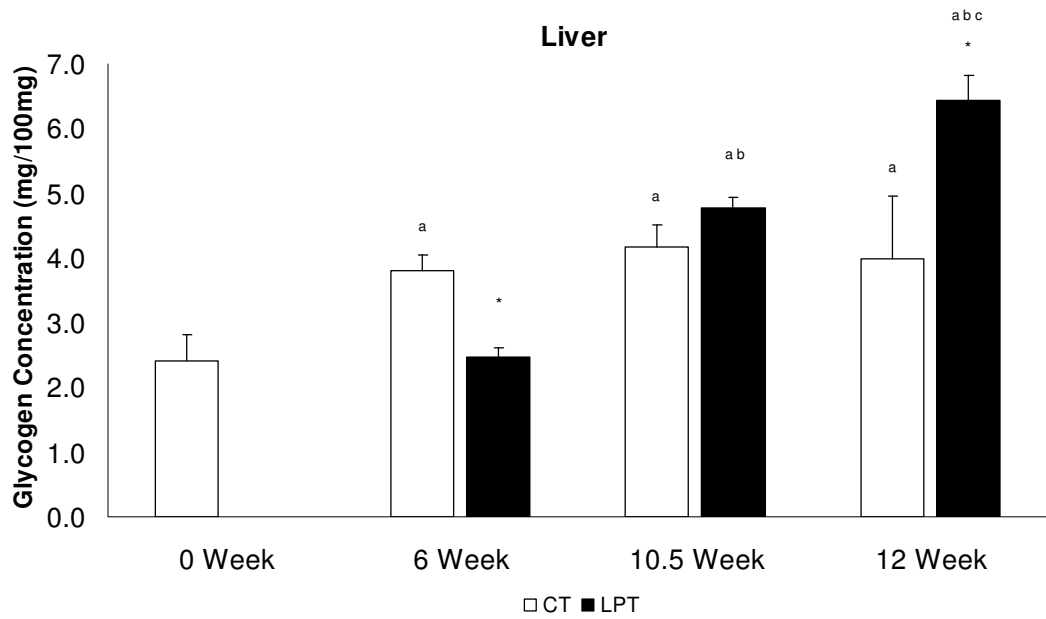


Figure 9. Values of glycogen concentration in liver muscle analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week (basic period), 10.5 week (specific period) and 12 week (taper).

- ^a Significant differences (P<0.05) in relation to 0 week.
- ^b Significant differences (P<0.05) in relation to 6 week.
- ^c Significant differences (P<0.05) in relation to 10.5 week.
- * Significant differences (P<0.05) in relation to CT group in respective period.

The CK concentration in CT was not altered along 12 weeks. For LPT, the CK concentrations reduced in relation to baseline after the 12 weeks (Figure 10).

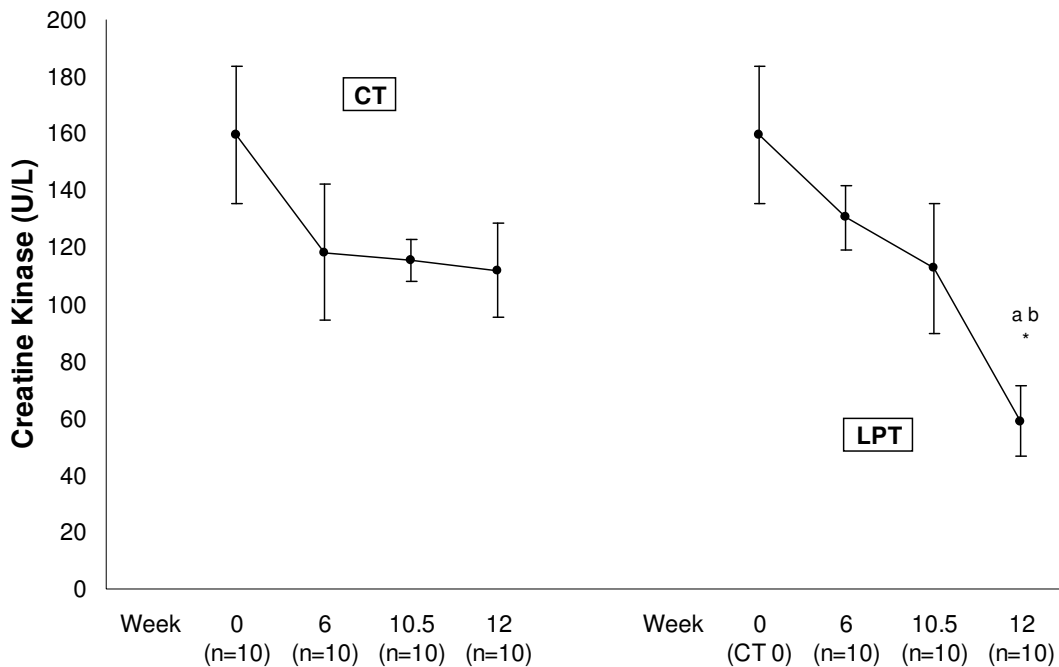


Figure 10. Creatine Kinase (CK) concentration in plasma analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week (basic period), 10.5 week (specific period) and 12 week (taper).

- ^a Significant differences (P<0.05) in relation to 0 week.
 - ^b Significant differences (P<0.05) in relation to 6 week.
 - * Significant differences (P<0.05) in relation to 0 CT group in respective period.
- CT 0 week (n=10), 6 week (n=10), 10.5 week (n=10) and 12 week (n=10).
 LPT 6 week (n=10), 10.5 week (n=9) and 12 week (n=9).

In LPT animals, lactate dehydrogenase increased 180% in comparison to CT after 6 week. Also, the levels of lactate dehydrogenase after 10.5 and 12 weeks in LPT returned to normal values (Figure 11).

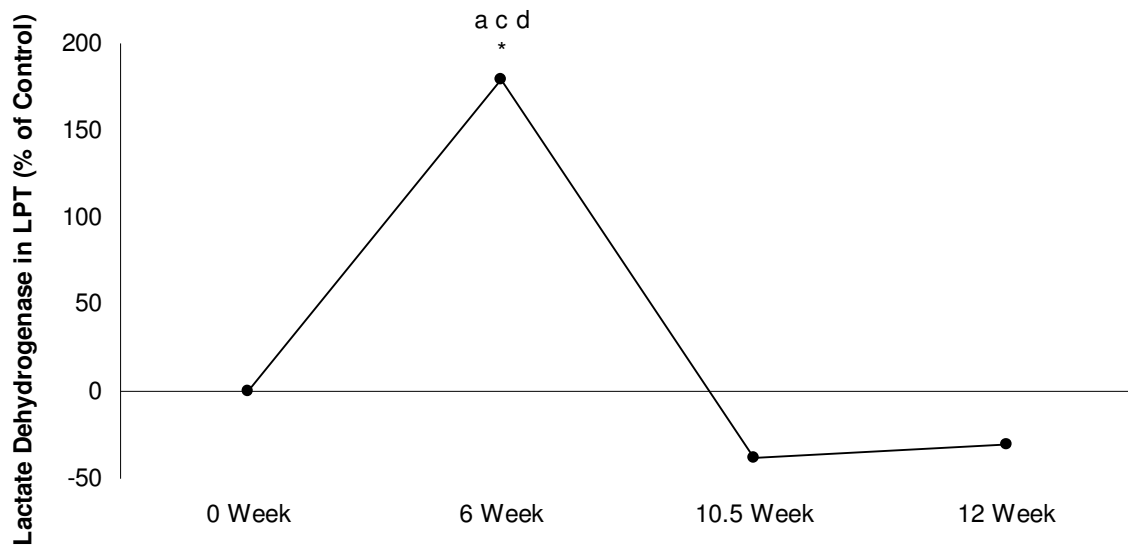


Figure 11. Variance (%) of lactate dehydrogenase obtained in LPT animals, expressed in percentual of the CT group in each training phase.

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

^c Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 10.5 week.

^d Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 12 week.

* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CT group in respective period.

The plasma corticosterone increased after 6 week in LPT but reduced after specific and taper period in comparison to CT group (Figure 12). The testosterone and the testosterone-corticosterone ratio ($\times 10^{-3}$) unchanged during training in both groups (Figure 13).

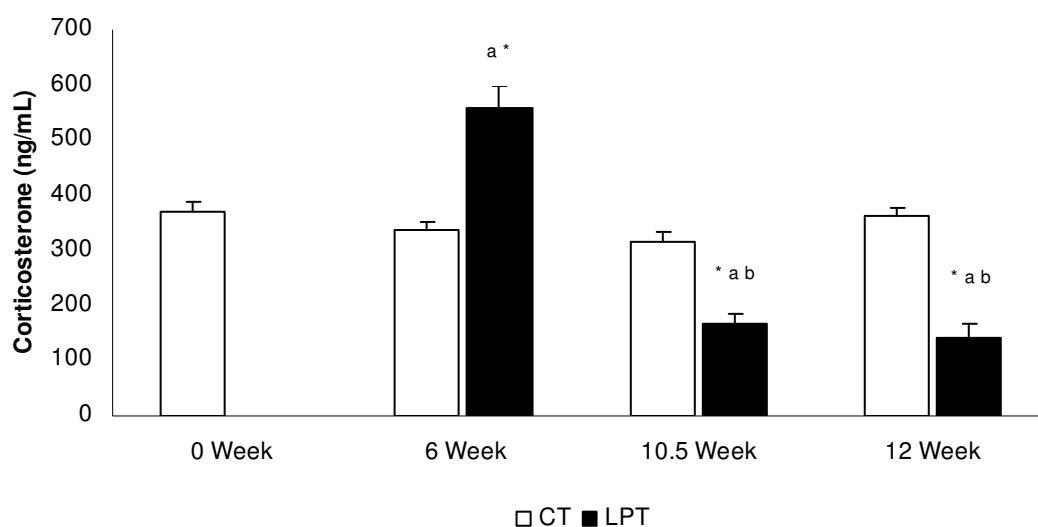


Figure 12. Corticosterone concentration in plasma analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week, 10.5 week and 12 week.

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

^b Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 6 week.

* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CT group in respective period.

CT 0 week (n=10), 6 week (n=10), 10.5 week (n=10) and 12 week (n=10).

LPT 6 week (n=10), 10.5 week (n=9) and 12 week (n=9).

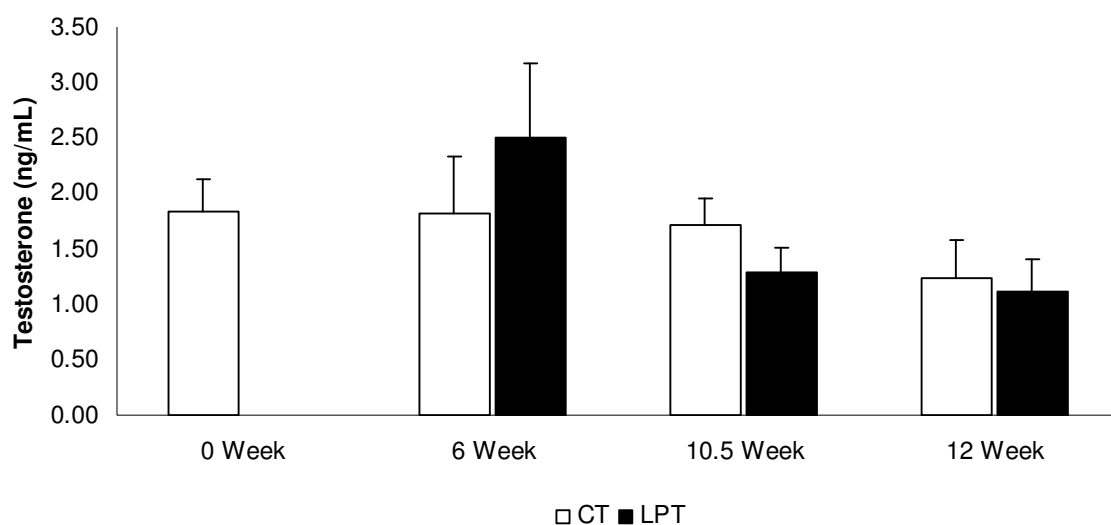


Figure 13. Testosterone concentration in plasma analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week, 10.5 week and 12 week.

CT 0 week (n=10), 6 week (n=10), 10.5 week (n=10) and 12 week (n=10).

LPT 6 week (n=10), 10.5 week (n=9) and 12 week (n=9).

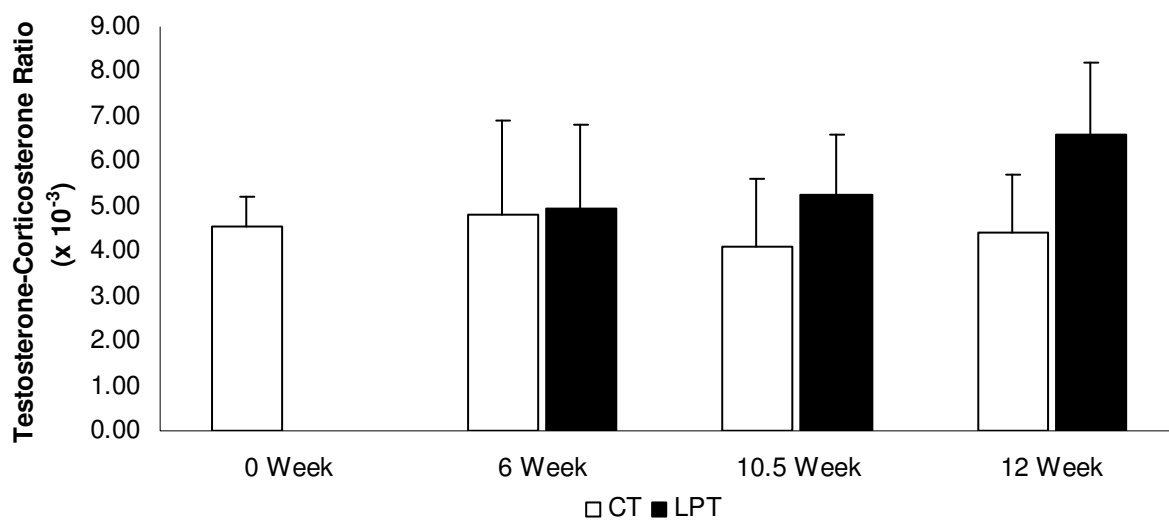


Figure 14. Testosterone/Corticosterone Ratio (Values x 10⁻³) analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week, 10.5 week and 12 week.

CT 0 week (n=10), 6 week (n=10), 10.5 week (n=10) and 12 week (n=10).

LPT 6 week (n=10), 10.5 week (n=9) and 12 week (n=9).

After 10.5 week the plasma Catalase increased in LPT in comparison to baseline and 6 week. The Catalase after taper decreased in LPT in relation to CT 12 week (Table 3). Sulphydryl Groups, SOD and Creatinine in plasma were unchanged in both groups when were compared in each period of training program (Table 3). Uric Acid and Urea concentration increased after 10.5 week and 12 week in both groups (LPT and CT) in relation 0 week (Table 3).

Table 3. Serum concentrations of Catalase, Superoxide Dismutase, creatinine, urea, uric acid and sulfhydryl groups in plasma in baseline (0 week) and after basic (6 week), specific (10.5 week) and taper (12 week) periods in CT and LPT group.

	0 Week	6 Week	10.5 Week	12 Week
Catalase (U/mL)				
CT		5.4 ± 1.8	5.0 ± 1.9	5.9 ± 1.3
LPT	4.14 ± 1.5	4.2 ± 0.7	11 ± 1.3 ^{* a b}	2.9 ± 0.3 [*]
Superoxide Dismutase (U/mL)				
CT		28.0 ± 9.6	24.4 ± 10.6	32.0 ± 7.1
LPT	23.2 ± 7.9	23.5 ± 10.7	29.2 ± 5.8	26.8 ± 7.9
Sulfhydryl Groups (µM)				
CT	1057 ± 61	1155 ± 84	858 ± 44	1150 ± 81
LPT		1273 ± 98	740 ± 65	1204 ± 161
Creatinine (mg/dL)				
CT		1.00 ± 0.272 ^a	0.729 ± 0.198	0.686 ± 0.117
LPT	0.583 ± 0.290	0.648 ± 0.290	0.820 ± 0.09	0.726 ± 0.192
Uric Acid (mg/dL)				
CT		3.85 ± 0.86	5.07 ± 0.73 ^{a b}	5.40 ± 0.93 ^{a b}
LPT	2.98 ± 0.31	3.73 ± 0.91	4.77 ± 0.92 ^{a b}	5.36 ± 0.81 ^{a b}
Urea (mg/dL)				
CT		52.5 ± 3.5 ^a	59.9 ± 16.6 ^a	64.6 ± 11.8 ^a
LPT	38.6 ± 6.4	46.2 ± 3.1 ^a	54 ± 5.7 ^a	57.2 ± 6.1 ^a

^a Different from Baseline (P<0.05). ^b Different from 6 Week (P<0.05). ^{*} Significant differences (P<0.05) in relation to 6 week ^{*} Different from CT in same time (P<0.05).

CT 0 week (n=10), 6 week (n=10), 10.5 week (n=10) and 12 week (n=10).

LPT 6 week (n=10), 10.5 week (n=9) and 12 week (n=9).

DISCUSSION

The objective of this study was to verify the effect of linear periodization training on the aerobic and anaerobic performance, glycogen stores (soleus, gastrocnemius and liver), hormones and metabolic enzymes in Wistar rats. Matveev's (1986) model of periodization training is characterized by the smooth oscillations between volume and intensity that leads to

a single peak of performance. Even criticized due to one peak of performance, the linear periodization was applied in present study due to long mesocycles and remarkable physiological responses after each block.

The first mesocycle (basic period) aimed to improve the aerobic capacity (prevalence of END1 and END2 series). On the other hand, it was expected a reduction in anaerobic capacity after this endurance period due to improvements as myoglobin content, Type I muscle fibers, intramuscular triglyceride and lipase lipoprotein (Costill et al., 1991). However, with insertion of END3 and ANA in specific period, it was expected an increase in anaerobic index (Tlim) (Fitts et al., 1989; Costill et al., 1991). In present study, independent of the mesocycle characteristic (aerobic or anaerobic prevalence), did not affect Tlim and the fall of aerobic capacity in relation to CT group.

The LM success rate (%) during the training in comparison CT group indicate LM as a sensitive protocol of evaluation for rats (Carter et al. 1999; Voltarelli et al., 2004) suggesting other mechanisms responsible for aerobic decrease. Possibly, the reduction of aerobic performance in CT and LPT occurred due to long period expended in cages (3 months) that leads to inactivity and inhibits the spontaneous activity of the animals. Curiously, the total volume was similar to the estimated showing LPT adaptations in rats.

The training periodization in rats enabled interesting physiological adaptations and can be an important tool to analyze precisely the mesocycles effects. The reduction of glycogen concentration in the liver after 6 weeks in LPT compared CT group, revealed the hepatic energetic contribution for the endurance training in rats. After 6 week, the elevated volume of training was associated with increased energetic hepatic demand as well as lactate dehydrogenase that may be related with damage to the liver (Motoo et al., 1991; Lee et al., 2009). Moreover, the CK-NAC isoform that is related with skeletal muscle damage showed decreasing values along the training period. This finding is in agreement with the increase in

the soleus glycogen concentration observed after 6 weeks and maintenance of concentration in gastrocnemius. Also, glycogen stores did not respond as expected after taper in the skeletal muscles (supercompensation). The lactate peak is considered a glycolytic capacity indicator and improves after supercompensation period (Halson and Jeukendrup, 2004). In the present study, the lactate peak increased even with muscle glycogen stores steady in CT after 10.5 and 12 weeks. Possibly, the glucose utilization does not depend of glycogen stores but need the mechanism (enzymes and hormones) responsible for glycogen cleavage.

The declines in CK and LDH concentration after specific and taper period showed that the LPT was effective in preventing to overtraining in rats due to oscillations between volume/intensity (Hedelin et al., 2000). The training volume performed without adaptations in muscles glycogen and Tlim can explain the lack of ANA stimulus during mesocycle 2 to other anaerobic adaptations as: glycolytic enzymes, acidose tolerance, lactate oxidation in other cells and glycogen supercompensation (Maglisho, 1999). Also, the reduction in 55% of the load in the taper in comparison specific period may have been excessive for rats, detraining partially the LPT group (MUJIKKA and PADILLA et al., 2003; PAPOTI et al., 2007). Even so, aerobic performance in LPT was higher than CT after 12 weeks. Therefore, with adjustment in specific and taper period in future studies, the aerobic and anaerobic capacity can increase above the baseline. However, this LPT must be re-programmed for rats due to considerably aerobic anaerobic natural decrease in CT group.

In relation to testosterone and corticosterone concentrations in athletes, so we researchers observed testosterone levels decreased after mesocycles and other studies do not verified changes in testosterone concentration in overtrained athletes (Halson and Jeukendrup, 2004). Our results showed that blood testosterone were unchanged during LPT but the corticosterone levels showed interesting responses after each mesocycle. The levels of stress were more pronounced during the training (basic period) than the levels of anabolism. After

this mesocycle 1, the reduction in volume reduced the stress of rats measured by corticosterone but increased catalase concentration after 10.5 week. Catalase is endogenous antioxidant enzymes with protective mechanism that attenuates the harmful effects of oxidants on the cells. Other studies showed modulation of catalase activity after high oxygen load (high volume of training) (Kostaropoulos et al., 2006). However, the catalase may be increased after anaerobic periods of training (Garcia-Lopez et al., 2007). In present study, the results showed important relationship between Catalase activity after anaerobic period.

The concentration of creatinine, uric acid and urea in both groups showed the similar concentration after mesocycles. The increasing these biomarkers in CT showed a natural response in species. Lehmann et al. (1991) did not found changes in serum creatinine in response to increased volume of training in runners and middle distance. So, the lack of studies on creatinine, uric acid and urea associated with exercise, prejudice the comparison with training models.

In summary, the aerobic performance in CT decreased after experimental period but the training periodization attenuated this natural aerobic fall. Therefore, the LPT to rats showed an important tool to evaluate specific effects of training and avoid negative adaptations of different biomarkers. This is supported by sensitive glycogen responses in soleus and liver mainly after aerobic (basic) and taper period as well as the unchanged SOD, CAT and others biomarkers stability. However, additional studies are necessary to identify aerobic and anaerobic performances after periods training.

REFERENCES

1. Buford TW, Rossi SJ, Smith DB, Warren AJ. A comparison of periodization models during nine weeks with equated volume and intensity for strength. *J Strength Cond Res.* 2007;21(4):1245-50.
2. Carter H, Jones AM, Doust JH. Effect of 6 weeks of endurance training on the lactate minimum speed. *J Sports Sci.* 1999;17(12):957-67.
3. Costill DL, Thomas R, Robergs RA, Pascoe D, Lambert C, Barr S, Fink WJ. Adaptations to swimming training: influence of training volume. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23(3):371-7.
4. deAraujo GG, Papoti M, Manchado Fde B, de Mello MA, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;148(4):888-92.
5. Dubois B, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* 28, 1956:350–356.
6. Fry RW, Morton AR, Keast D. Periodisation and the prevention of overtraining. *Can J Sport Sci.* 1992;17(3):241-8
7. Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;130(1):21-7.
8. Haff GG. Roundtable Discussion: Periodization of Training – Part1. National Strength and Conditioning Association, Vol. 26, number1.
9. Halson SL, Jeukendrup AE. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med.* 2004;34(14):967-81.

10. Hedelin R, Kentta G, Wilklund U, Wiklund U, Bjerle P, Henriksson-Larsén K. Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(8):1480–84.
11. Hoffman JR, Ratamess NA, Klatt M, Faigenbaum AD, Ross RE, Tranchina NM, McCurley RC, Kang J, Kraemer WJ. Comparison between different off-season resistance training programs in Division III American college football players. *J Strength Cond Res.* 2009; 23(1):11-9
12. Impellizzeri FM, Rampinini E, Coutts AJ, Sassi A, Marcora SM. Use of RPE-based training load in soccer. *Med Sci Sports Exerc.* 2004 Jun;36(6):1042-7.
13. Issurin V. Block periodization versus traditional training theory: a review. *J Sports Med Phys Fitness.* 2008 ;48(1):65-75.
14. Kok LY, Hamer PW, Bishop DJ. Enhancing muscular qualities in untrained women: linear versus undulating periodization. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(9):1797-807.
15. Lee SH, Kim HJ, Mun JS, Oh HC, Lee HW, Choi CH, Kim JW, Do JH, Kim JG, Chang SK, Kim MK. A case of primary hepatic Burkitt's lymphoma. *Korean J Gastroenterol.* 2008;51(4):259-64.
16. Manchado Fde B, Gobatto CA, Voltarelli FA, Rostom de Mello MA. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006;31(6):731-6.
17. Matveev, L.P. *Fundamentos do treino desportivo.* Lisboa: Ed. Horizonte., 1986.
18. McArdle WD, Montoye HJ. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J Appl Physiol.* 1966 Jul;21(4):1431-4.
19. Motoo Y, Ohta H, Okai T, Sawabu N. Adult-onset Still's disease: hepatic involvement and various serum markers relating to the disease activity. *Jpn J Med.* 1991;30(3):247-50.

20. Mujika I, Padilla S. Scientific bases for precompetition tapering strategies. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(7):1182-7.
21. Papoti M, Martins LE, Cunha SA, Zagatto AM, Gobatto CA. Effects of taper on swimming force and swimmer performance after an experimental ten-week training program. *J Strength Cond Res.* 2007;21(2):538-42.
22. Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993 May;25(5):620-7.
23. Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(11):1389-94.

10.6 APÊNDICE 6

Araujo GG, Papoti M, Reis IGM, Mello MAR, Gobatto CA. RESPOSTAS DE BIOMARCADORES DURANTE PERIODIZAÇÃO DO TREINAMENTO EM BLOCOS EM RATOS WISTAR

RESUMO

Caracterizar as adaptações fisiológicas e de *performance* aeróbia e anaeróbia por meio do teste de lactato mínimo ao longo de uma periodização em blocos com duração de 12 semanas em ratos Wistar submetidos a exercício de natação. Especificamente, dividir o período total de treinamento (12 semanas) em três blocos com diferentes durações (6 semanas, 4,5 semanas e 1,5 semanas) para avaliar ao término de cada bloco biomarcadores de treinamento. O treinamento periodizado em blocos também foi dividido em três períodos com duração de 6 semanas (Bloco 1), 4,5 semanas (Bloco 2) e 1,5 semanas (Bloco 3) sendo que em cada bloco conteve os períodos básico, específico e polimento com intensidades equivalentes ao peso corporal dos animais (% do PC) variando entre 80 e 240% do limiar anaeróbio individual. Os valores de T_{lim} (s) obtidos no GC reduziram após bloco 1, bloco 2 e bloco 3 em relação a Linha de Base. As concentrações de lactato desidrogenase (LDH) e testosterona não apresentaram diferenças ao longo dos blocos de treinamento. Ao final do bloco 1 a concentração de corticosterona aumentou em relação ao início (LB) do treinamento e ao controle (GC). Ao término do bloco 1 o glicogênio hepático reduziu significativamente e retornou a valores próximos do GC no bloco 2 e bloco3. O glicogênio do músculo sóleo no GB aumentou após o bloco 1 em relação ao controle e apresentou valores próximos ao GC ao final do bloco 2 e bloco 3. O conteúdo de glicogênio do gastrocnêmio aumentou ao final de 6 semanas para ambos os grupos experimentais e se manteve até 12 semanas. Ao longo da periodização em blocos (GB) a concentração de creatina quinase foi menor em comparação ao GC. Em conclusão, a periodização em blocos foi eficiente em melhorar a *performance* anaeróbia mas não aumentou a capacidade aeróbia. O treinamento periodizado em blocos permitiu adaptações no conteúdo de glicogênio principalmente após o bloco 1 o qual os períodos de treinamento tiveram maior duração. Os biomarcadores analisados não apresentaram grandes alterações em relação ao grupo controle.

INTRODUÇÃO

A aplicação de programas de treinamento em seres humanos muitas vezes não respeita o planejamento proposto devido a lesões e derrotas/vitórias inesperadas, o que dificulta entender as efetivas respostas fisiológicas com o modelo aplicado. Atualmente, devido ao denso e competitivo calendário esportivo, o planejamento do treinamento deve possibilitar inúmeros picos de *performance* necessitando muitas vezes de re-estruturação ao longo da temporada (Verkoshanski, 1990).

A partir da utilização de modelos animais na fisiologia do exercício experimental, a prescrição de treinamento em ratos vem sendo uma ferramenta interessante para verificar adaptações condizentes com aplicação da sobrecarga (Gobatto et al., 2001; Carvalho et al., 2005). No entanto, ainda são escassos os estudos na literatura que buscam aplicar diferentes modelos de treinamento periodizado em ratos com a finalidade de verificar as respostas fisiológicas em cada macrociclo semelhantemente ao desenvolvido por atletas. Devido às semelhanças fisiológicas encontradas em ratos em relação a seres humanos (Pilis et al., 1993; Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2006), associadas ao maior número de análises possíveis nesses animais, o estudo de diferentes métodos de treinamento periodizado em ratos pode ser uma estratégia interessante possibilitando também um maior controle de fatores extrínsecos.

Assim, o presente estudo objetivou caracterizar as adaptações fisiológicas e de *performance* ao longo de uma periodização em blocos com duração de 12 semanas em ratos Wistar submetidos a exercício de natação. Especificamente, dividir o período total de treinamento (12 semanas) em três blocos com diferentes durações (6 semanas, 4.5 semanas e 1.5 semanas) para avaliar ao término de cada bloco a performance aeróbia e anaeróbia por meio do teste de lactato mínimo bem como biomarcadores de treinamento (creatinina, ácido

úrico, uréia, creatina quinase, lactato desidrogenase, catalase, superóxido dismutase, testosterona, corticosterona e glicogênio hepático, sóleo e gastrocnêmio).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 70 ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 60 dias de idade. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, não excedendo 5 ratos por gaiola, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os animais receberam ração comercial e água “*ad libitum*”. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos: controle (GC n= 40) e periodizado blocos (GB n=30). A realização dos experimentos seguiu as resoluções específicas (Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979; Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934).

Adaptação ao meio líquido

Os ratos foram adaptados ao meio líquido ($31\pm 1^\circ\text{C}$) por 2 semanas (5-10 minutos de duração, 5 dias/semana), em tanques cilíndricos individuais profundos (120 x 60 cm). Após o início do treinamento, os ratos do GC mantiveram a rotina de adaptação ao meio líquido 2 dias/semana.

Performances anaeróbia e aeróbia

As *performances* aeróbia e anaeróbia foram assumidas como intensidade de lactato mínimo (LM) e tempo limite (Tlim). Para determinação dessas variáveis, foi utilizado o protocolo de lactato mínimo (LM) validado por Tegtbur et al. (1993) em humanos, aplicado a ratos por Voltarelli et al. (2002) e aprimorado para esses animais por deAraujo et al. (2007).

O procedimento de avaliação da *performance* anaeróbia serviu como método para indução da hiperlactacidemia com uma carga correspondente a 13% do PC. Os animais realizaram 2 esforços nessa primeira fase do teste sendo o primeiro com duração de 30 s e

após intervalo de 30 s, a realização do segundo esforço na mesma carga até exaustão (T_{lim}). Amostras sanguíneas (25µL) foram coletadas da extremidade distal da cauda aos 1, 3, 5, 7 e 9 min após o T_{lim} para determinação da concentração pico de lactato (mmol.L⁻¹).

Imediatamente após 9 minutos de intervalo passivo, os ratos foram submetidos a um teste incremental para determinação da intensidade de LM (*performance* aeróbia) correspondente ao equilíbrio entre remoção e produção do lactato. As cargas foram equivalentes a 3,5 -4,0- 4,5- 5,0- 5,5 e 6,5% do PC de cada animal. Cada estágio do protocolo progressivo foi composto por 5 minutos de duração com intervalo de 30 s para determinação da lactacidemia. A relação obtida entre a concentração de lactato e a carga (porcentagem do peso corporal) foi ajustada por uma equação polinomial de ordem 2, sendo que LM foi considerado a derivada zero desse ajuste (deAraujo et al., 2007).

Sessões de treinamento: Classificação e Quantificação dos estímulos aplicados

Os estímulos aplicados durante as sessões de treinamento para o GB foram divididos em séries objetivando o desenvolvimento da aptidão aeróbia e anaeróbia. O treinamento aeróbio foi subdividido em 3 níveis: *Endurance* fácil (END1), moderado (END2) e Intenso (END 3). O treinamento na intensidade de END 1 compreendeu exercícios contínuos com duração alvo de 60 minutos e realizados em intensidades de 80% do LM. Foram classificados como séries de END2, os nados contínuos realizados na intensidade correspondente ao LM com duração alvo de 30 minutos. Os estímulos de END3 envolveram nados intervalados com duração de 5 minutos e 1 minuto de recuperação, totalizando 15 minutos de exercício com intensidades a 120% do LM adaptado de Maglisho, (1999).

Os treinamentos com o objetivo de desenvolver a aptidão anaeróbia (ANA) tiveram 5 esforços intervalados com duração de 1 minuto e pausa de 3 minutos, com intensidades entre 220 a 260% do LM.

Ao final dos blocos 1 e 2 foi realizado o período de polimento no qual teve uma redução de 50% no volume das séries de treinamento em relação ao aplicado nos períodos básico e específico.

Treinamento Periodizado em Blocos

O treinamento periodizado em blocos (GB) apresentou duração total de 12 semanas, sendo sub-dividido em 3 blocos com duração distinta (6 semanas; 4,5 semanas e 1,5 semanas). Os blocos 1 e 2 foram divididos em período preparatório básico (PPB), específico (PPE) e polimento (PP) enquanto que para o bloco 3 foram aplicados estímulos de manutenção da carga com volume treinamento igual ao do polimento do bloco 2 (Tabela 1).

Tabela 1. Organização do treinamento utilizando as intensidades (END1, END2, END3 e ANA) ao longo de 12 semanas de treinamento periodizado em blocos.

SEMANAS	Seg	Ter	Qua	Qui	Sex	Sab	FASES
				BLOCO 1			
1	<i>TESTE</i>	END1	END2	END1	END2	END1	PPB
2	END2	END1	END2	END1	END2	END1	PPB
3	END1	END2	END3	END1	END2	END1	PPB
4	END2	END3	END1	END3	END1	END3	PPE
5	END2	ANA	END1	END3	END1	ANA	PPE
6	END2	ANA	END1	END2	ANA	END1	PP
				BLOCO 2			
7	<i>TESTE</i>	END2	END1	END2	END1	END2	PPB
8	END2	END1	END2	END1	END2	END1	PPB
9	END2	ANA	END1	ANA	END1	ANA	PPE
10	END2	ANA	END1	ANA	END1	ANA	PPE/PP
11	END2	ANA	-	<i>TESTE</i>			PP
				BLOCO 3			
11					END1	ANA	Manutenção
12	END2	ANA	END1	END3	END1	ANA	Manutenção

Análises bioquímicas

Dez ratos de cada grupo (GC e GB) foram sacrificados e avaliados após a adaptação (Linha de Base –LB) e 24 horas após cada bloco da periodização para determinação dos parâmetros bioquímicos, musculares, hepáticos e de *performance* aeróbia e anaeróbia.

Concentração de Lactato

Foram obtidas amostras de sangue (25µL), com auxílio de tubo capilar pré-calibrado e heparinizado, depositadas em tubos de microcentrifuga (1,5mL) contendo 400µL de ácido tricloroacético 4%. As amostras foram homogeneizadas e posteriormente centrifugadas para retirada de 100 µL do sobrenadante. O sobrenadante foi acrescentado em 500 µL de reativo contendo: Glicina/EDTA e Reativo Enzimático: Lactato Desidrogenase e Beta-NAD. As concentrações de lactato foram determinadas por meio do método enzimático por espectrofotometria. A Leitura foi efetuada a 340 nm (ENGELS e JONES, 1978).

Creatina Quinase – NAC (CK)

Para mensuração da atividade plasmática da Creatina Quinase-NAC, foram realizadas análises utilizando-se o kit "Laborlab CK NAC-ativado". O cálculo da atividade de CK (U/L) na amostra será feito pela equação $CK_p = 8035 \times \Delta\text{absorbância}/\text{minuto}$.

Glicogênio muscular (Sóleo e Gastrocnêmio) e Hepático

Frações pesando entre 200-250mg do músculo sóleo e gastrocnêmio e 500mg do fígado foram retiradas imediatamente após a eutanásia e foram digeridas em KOH 1N durante 20 minutos. Posteriormente, foram adicionadas solução saturada de Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado por meio de duas passagens utilizando etanol fervente, seguida de centrifugação. A determinação colorimétrica foi realizada com a adição de de fenol a 80% e ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro 490nm (Dubois et al., 1956).

Uréia

Para determinação da uréia sérica foi utilizado o método enzimático por meio do kit Laborlab® (CAT N° 02800). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm ajustando o zero do aparelho com o branco (NOGUEIRA et al., 1990).

Creatinina

Foram separados 100µL da amostra de soro e adicionadas a 1 mL de reagente (Solução de Ácido Pírico 41,4 mmol/L, Solução de Glicina - NaOH 1 mol/L e Solução Ácida) para posterior determinação da absorbância em 510 nm aos 30 e 90 segundos (Kit Bioclin N° K067).

Testosterona

Para determinação dos níveis de testosterona, foram utilizados 50µL de soro e posteriormente aplicado a técnica do kit *Coat-A-Count* -radioimunoensaio de fase sólida, baseado nos anticorpos específicos à testosterona imobilizados nas paredes dos tubos de polipropileno. Cada tubo foi contado 1 minuto em contador gama (Gênese kit®).

Corticosterona

Foram utilizados 25µL de soro para a determinação da corticosterona por meio de kit específico *Coat-A-Count*- radioimunoensaio de fase sólida em que a corticosterona marcada com ¹²⁵I (105ml) compete durante um período de tempo fixo com a corticosterona na amostra por locais de fixação de anticorpos. Cada tubo foi contado durante 1 minuto em contador gama (Gênese Kit®).

Concentração Ácido Úrico

As análises para determinação da concentração de ácido úrico no plasma foram conduzidas de acordo com Town et al. (1985), por meio de Kit específico Laborlab®.

Grupamentos sulfidrila (GS) totais em plasma

Uma alíquota de 50 μ l do plasma foi misturada em 1 ml de tampão Tris-EDTA (1mM), com a primeira leitura sendo feita a 412 nm (leitura A_1). Após essa leitura foi adicionado 20 μ l de 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 10mM, diluído em metanol. Após um período de 15 minutos foi realizado uma nova leitura (leitura A_2). O branco (B) conteve somente DTNB e tampão Tris-EDTA. Os grupamentos sulfidrila totais foram calculados usando o coeficiente de absorção molar= $13,600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Faure & Lafond, 1995) onde $(A_2-A_1-B) \times 1,57\text{mM}$.

Atividade Plasmática da Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

O sangue foi coletado diretamente do ventrículo esquerdo e misturado a solução de heparina para centrifugação e armazenamento. As análises de GPx, CAT e SOD foram realizadas por meio de Kits comerciais Cayman Chemical No. 703102, No. 707002 e No. 706002 utilizando ELISA.

RESULTADOS

A figura 1 mostra os valores do volume médio de treinamento estimado e real bem como a intensidade em cada bloco (Figura 1). O volume realizado no bloco 1 apresentou uma área 10% menor que a estimada, enquanto que no bloco 2 o volume estimado foi 19% maior que o real e para o bloco 3 o tempo realizado foi 46% menor em relação ao estimado.

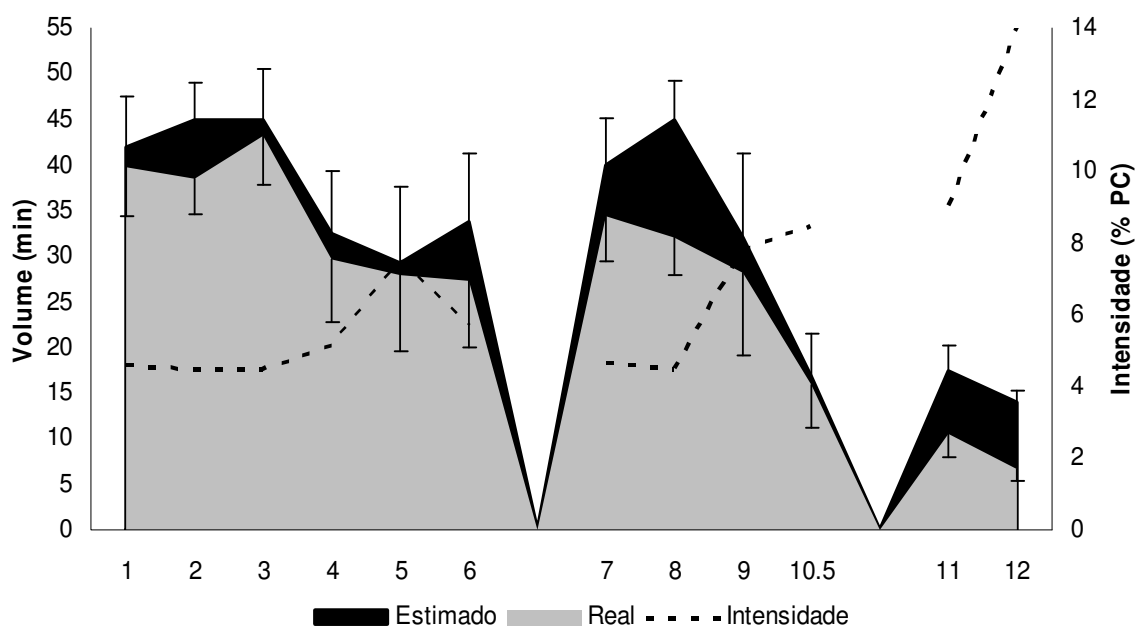


Figura 1. Comportamento estimado (estimado menos o real) e real das variáveis, volume e intensidade durante os blocos de treinamento ao longo de 12 semanas. O Bloco-1 teve duração de 6 semanas, o Bloco-2 4,5 semanas e o bloco-3 1,5 semanas. A intensidade de treinamento foi aplicada de acordo com os períodos básico, específico e polimento implementados em cada bloco.

A tabela 1 mostra os valores de concentração pico de lactato após Tlim, os valores de R^2 obtidos pelo ajuste polinomial de ordem 2 e os valores de lactato mínimo (% do PC) que não modificou em ambos os grupos.

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão da concentração pico de lactato após indução da hiperlactacidemia (13% do PC), de R^2 dos ajustes polinomial de ordem 2 obtidos na fase incremental do teste de lactato mínimo e da intensidade correspondente ao lactato mínimo (% do PC).

	Linha de Base (LB)	BLOCO 1	BLOCO 2	BLOCO 3
Concentração Pico de Lactato (mmol/L)				
GC		5,6 \pm 1,42	6,29 \pm 1,39	5,95 \pm 1,65
GB	5,53 \pm 1.12	6,88 \pm 1,45	6,34 \pm 1,73	5,87 \pm 0,95
R^2				
GC		0,99 \pm 0,01	0,90 \pm 0,09	0,99 \pm 0,01
GB	0,93 \pm 0,04	0,91 \pm 0,07	0,95 \pm 0,06	0,90 \pm 0,09
Intensidade de Lactato Mínimo (% do PC)				
GC		4.19 \pm 0.40	3.80 \pm 0.41	3.55 \pm 0.32
GB	4.93 \pm 0.85	4.67 \pm 0.50	4.30 \pm 0.42	3.83 \pm 0.54

Os valores de Tlim (s) obtidos no GC reduziram após bloco 1, bloco 2 e bloco 3 em relação a Linha de Base. Para o GB, a *performance* anaeróbia apresentou valores superiores ao GC em todos os blocos (Figura 2).

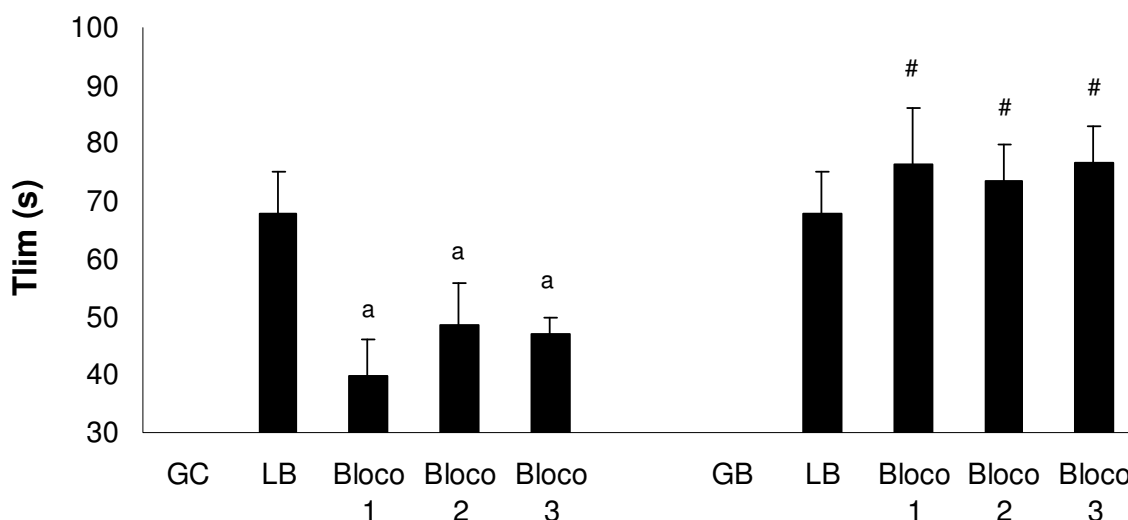


Figura 2. Valores \pm desvio padrão de Tlim (s) mensurados ao final de cada bloco de treinamento para o grupo controle (GC) e periodizado em blocos (GB) durante a fase de indução da hiperlactacidemia (13% do PC). ^a Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação a LB. # Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao GC no respectivo

As concentrações de lactato desidrogenase (LDH) e testosterona não apresentaram diferenças ao longo dos blocos de treinamento (Tabela 3). No entanto, para os metabólitos creatinina, ácido úrico e uréia, as concentrações aumentaram em ambos os grupos em relação à LB (Tabela 3). Ao final do bloco 1 a concentração de corticosterona aumentou

em relação a LB e ao GC. A concentração de corticosterona aumentou ao final do bloco 1 no GB e reduziu ao final do Bloco 2 e Bloco 3 em relação ao GC (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios da concentração plasmática de lactato desidrogenase (LDH), creatinina, ácido úrico, uréia, grupamento sulfidrila e testosterona na linha de base e ao término dos blocos 1, 2 e 3.

	Linha de Base (Semana 0)	BLOCO 1	BLOCO 2	BLOCO 3
LDH (U/L)				
GC	98 ± 15	79 ± 15	102 ± 23	93 ± 15
GB		102 ± 26	98 ± 16	71 ± 15
Creatinina (mg/dL)				
GC	0.58 ± 0.29	1.04 ± 0.27 a	0.72 ± 0.19 a	0.68 ± 0.11 a
GB		0.765 ± 0.14 a	0.91 ± 0.12 a b [#]	0.96 ± 0.23 a b [#]
Ácido Úrico (mg/dL)				
GC	2.98 ± 0.31	3.86 ± 0.86	5.07 ± 0.73 a	5.40 ± 0.93 a
GB		3.97 ± 0.66	5.22 ± 0.75 a	5.90 ± 0.81 a b
Uréia (mg/dL)				
GC	38.6 ± 6.4	52.6 ± 3.5 a	59.9 ± 16.6 a	64.6 ± 11.2 a
GB		53.7 ± 15.8 a	56.9 ± 8.3 a	56.2 ± 4.2 a
Testosterona (ng/mL)				
GC	1.83 ± 0.85	1.82 ± 1.55	1.70 ± 0.76	1.23 ± 1.02
GB		1.40 ± 1.26	2.06 ± 1.43	1.47 ± 0.53
Corticosterona (ng/mL)				
GC	370 ± 18	335 ± 16	315 ± 17	362 ± 14
GB		527 ± 27 # a	184 ± 23 # a b	173 ± 18 # a b
Razão Testosterona/Corticosterona (x10⁻³)				
GC	4.55 ± 0.62	4.80 ± 2.11	4.08 ± 1.54	4.42 ± 1.27
GB		4.50 ± 1.29	10.84 ± 1.41 ab	6.89 ± 1.25 c

^a Diferença significativa (P<0.05) em relação à LB. ^b Diferença significativa (P<0,05) em relação ao bloco 1. # Diferença significativa (P<0,05) em relação ao GC no respectivo bloco.

Ao término do bloco 1 o glicogênio hepático reduziu significativamente e retornou a valores próximos do GC no bloco 2 e bloco3 (Figura 3-C). Em contrapartida, o glicogênio do músculo sóleo no GB aumentou após o bloco 1 em relação ao controle e apresentou valores

próximos ao GC ao final do bloco 2 e bloco 3 (Figura 3-B). O conteúdo de glicogênio do gastrocnêmio aumentou ao final de 6 semanas para ambos os grupos experimentais e se manteve até 12 semanas (Figura 3-A).

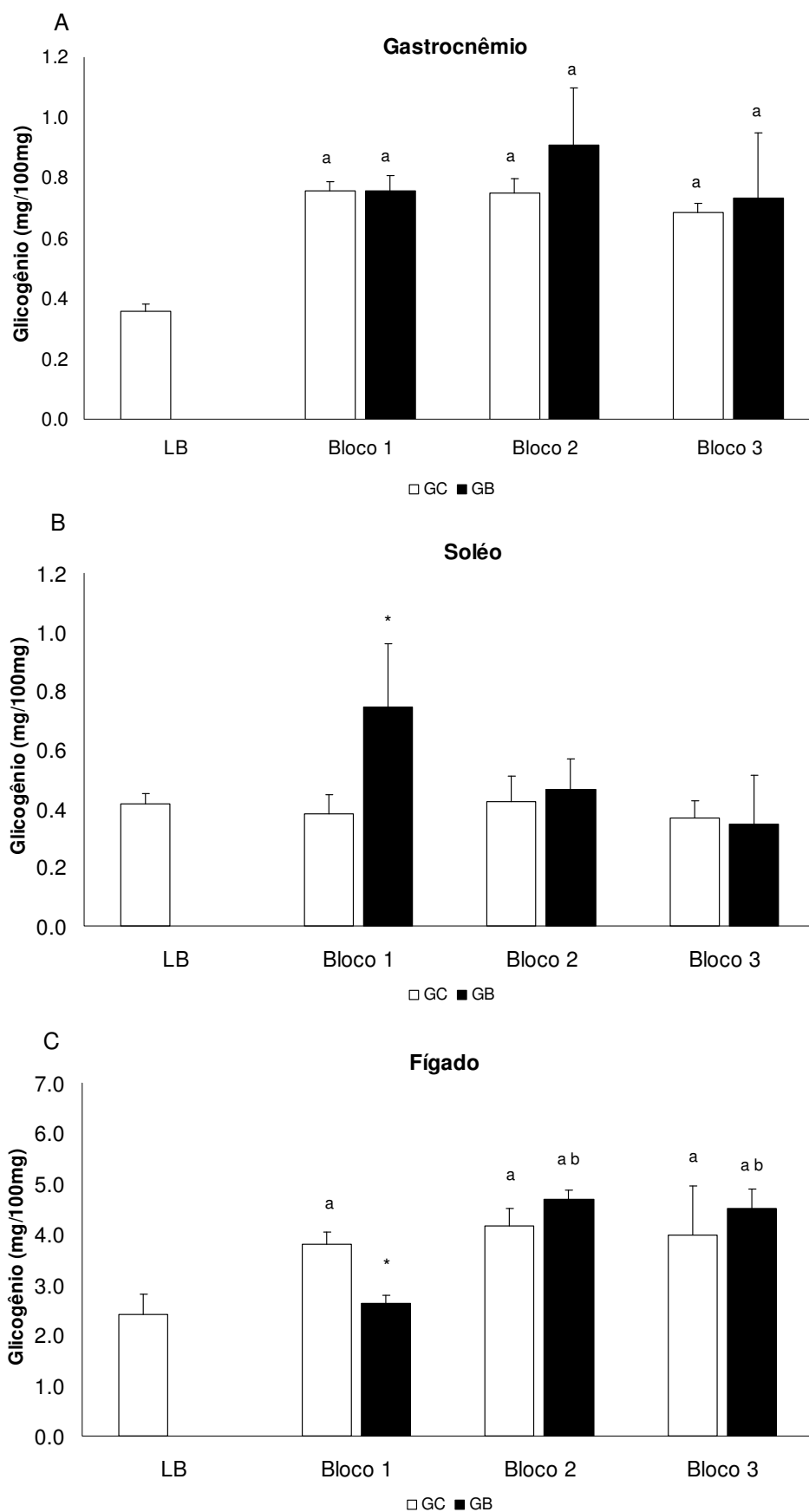


Figura 3. Concentração de Glicogênio dos músculos Gastrocnêmio (A) e Sóleo (B) e hepático (C) na linha de base e ao final dos blocos 1, 2 e 3. * Diferença significativa em relação ao GC no mesmo período. ^a Diferença significativa em relação a LB. ^b Diferença significativa em relação ao Bloco 1.

Ao longo da periodização em blocos (GB) a concentração de creatina quinase foi menor em comparação ao GC (Figura 4).

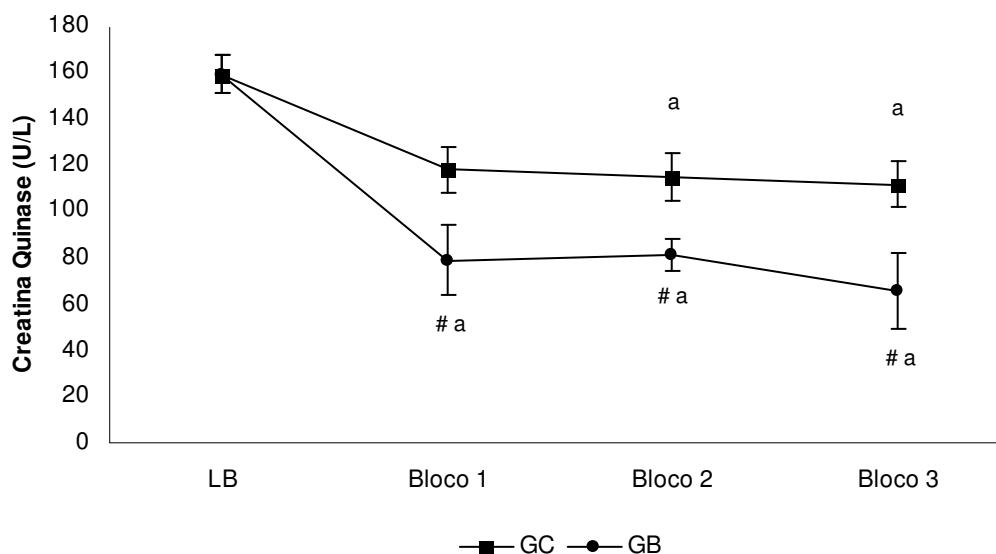


Figura 4. Valores absolutos de CK (U/L) ao longo da periodização nos diferentes blocos de treinamento para o GC e GB. ^a Diferença significativa em relação a LB. # Diferença significativa em relação ao GC no mesmo período.

A atividade plasmática da Catalase diminuiu ao término do bloco 3 em relação ao bloco 2 e GC (Tabela 4). Os valores da enzima superóxido dismutase e grupamento sulfidrila mantiveram-se estáveis durante o período experimental para o GC e GB (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios da concentração plasmática de Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e grupamento sulfidrila na linha de base e ao término dos blocos 1, 2 e 3.

	Linha de Base (Semana 0)	BLOCO 1	BLOCO 2	BLOCO 3
Catalase (nmol/min/mL)				
GC	4.1 ± 1.5	5.4 ± 1.8	5.1 ± 1.9	5.9 ± 1.3
GB		3.9 ± 0.6	5.8 ± 0.3	3.2 ± 0.4 ^{#c}
Superóxido Dismutase (U/mL)				
GC	22.5 ± 2.3	20.7 ± 2.7	28.0 ± 3.2	24.4 ± 3.5
GB		25.0 ± 2.2	25.8 ± 1.7	22.4 ± 2.4
Grupamento Sulfidrila (µM)				
GC	1057 ± 61	1155 ± 84	858 ± 44	1150 ± 81
GB		1033 ± 142	964 ± 107	915 ± 30

[#] Diferença significativa em relação ao GC no mesmo período. ^c Diferença significativa em relação ao Bloco 2.

DISCUSSÃO

A periodização em blocos proposta inicialmente por Verkoshanski (1990) tem como objetivo a obtenção de vários picos de *performance* ao longo da temporada de treinamento. Utilizando o modelo animal, foi possível simular situações de treinamento periodizado comumente aplicados em seres humanos. No entanto, a obtenção de vários picos de *performance* não foi observada para a capacidade aeróbia mas atenuou para o índice anaeróbio (T_{lim}).

Os valores de capacidade aeróbia no GC e GB se mantiveram ao longo do período experimental. Em parte, a execução das séries anaeróbias ao final dos blocos de treinamento influenciou possíveis adaptações aeróbias obtidas no início de cada bloco (PPB). Desse modo, a aplicação do polimento ao término dos blocos resultou em ganhos mais efetivos na capacidade anaeróbia (T_{lim}) em relação à aeróbia, o que já foi postulado por Mujika et al. (2004). Além disso, o período de polimento ao término de cada bloco foi eficaz na recuperação muscular reduzindo significativamente os valores de CK em relação ao GC (Fry et al., 1992; Halson e Jeukendrup, 2004; Brancaio et al., 2008) bem como mantendo estável a atividade plasmática da superóxido dismutase e concentração dos grupamentos sulfidrila. Para a catalase, provavelmente o período de polimento ao final dos blocos também foi eficaz em manter a atividade plasmática antioxidante inalterada diminuindo ainda seus valores ao final do bloco 3 o qual foi o período com menor volume de treinamento.

Em relação ao volume de treinamento, mesmo os animais não suportando totalmente o tempo de treinamento imposto, foi possível observar um comportamento semelhante ao prescrito. Assim, a extrapolação das séries de treinamento de humanos (Maglisho, 1999) para ratos pode ser uma estratégia interessante para avaliar os modelos de treinamento.

Os menores valores de glicogênio no fígado após o bloco 1 pode ter ocorrido devido a maior duração do período básico que conteve maior número séries aeróbias. Em

contrapartida, houve aumento dos valores de glicogênio no músculo sóleo ao final do bloco 1. Essa divergência entre concentração de glicogênio hepático em relação ao músculo sóleo pode ser devido ao tempo prolongado do período básico no bloco 1 o qual aumentou a utilização das reservas no fígado bem como estimulou a supercompensação de uma musculatura mais requisitada para o exercício aeróbio (sóleo) (Lambertucci et al., 2008). No entanto, o conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio aumentou em relação à Linha de Base em ambos os grupos ao longo do período experimental não apresentando supercompensação energética no GB além dos valores do GC. Possivelmente, o tempo de recuperação (24 horas) após o Tlim não tenha sido suficiente para repleção completa da capacidade do músculo gastrocnêmio.

Para os parâmetros hormonais, apenas a concentração de corticosterona aumentou ao final do bloco 1 enquanto que a concentração de testosterona não se alterou ao longo do treinamento. Urhausen et al. (1998), verificaram em indivíduos com *overtraining* significativa diminuição da *performance* em atletas de *endurance* e concentrações de testosterona normais. Esses mesmos autores relataram que indivíduos em *overtraining* apresentaram cortisol sérico aumentado em relação a indivíduos com atividade física normal. No entanto, não se pode caracterizar o *overtraining* nesses animais após o bloco 1 devido a incompatibilidade com outros parâmetros e análises bioquímicas (Hooper et al., 1993; Mackinnon et al., 1997). Esse aumento da corticosterona pode ser atribuído a realização de 90% do volume de treinamento imposto no bloco 1 enquanto que para os blocos 2 e 3 o volume real diminuiu em relação ao estimado.

Em conclusão, a periodização em blocos foi eficiente em melhorar a *performance* anaeróbia mas não aumentou a capacidade aeróbia provavelmente devido a característica de alta intensidade e reduzido volume do período de polimento em cada bloco. Além disso, o treinamento periodizado em blocos permitiu adaptações no conteúdo de glicogênio

principalmente após o bloco 1 o qual os períodos de treinamento tiveram maior duração. Os biomarcadores analisados não apresentaram grandes alterações em relação ao grupo controle mostrando a eficiência da periodização em prevenir o *overtraining*.

REFERÊNCIAS

- Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull.* 2007;81-82:209-30.
- Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FA. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;140(4):409-13.
- deAraujo GG, Papoti M, Manchado Fde B, de Mello MA, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;148(4):888-92.
- Dubois B, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28:350–356.
- Fry RW, Morton AR, Garcia-Webb P, Crawford GPM, Keast D. Biological responses to overload training in endurance sports. *Eur J Appl Physiol.* 1992, 64: 335-44.
- Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;130(1):21-7.
- Halson SL, Jeukendrup AE. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med* 2004;34: 967-81.
- Hooper SL, Mackinnon LT, Gordon RD, Bachmann AW. Hormonal responses of elite swimmers to overtraining. *Med Sci Sports Exerc.* 1993, 25: 741-747.
- Lambertucci, R.H., Piris-Levada, A.C., Rossoni, L.V., Curi, R., and Curi, T.C.P. 2007. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in

soleus muscle from young and aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development*. 128, 267–275.

Mackinnon LT, Hooper SL, Jones S, Gordon RD, Bachmann A. Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in swimmers. *Med Sci Sports Exerc*. 1997, 29: 1637-1645.

Maglisho EW. *Nadando Ainda Mais Rápido*. São Paulo: Manole, 1999.

Manchado Fde B, Gobatto CA, Voltarelli FA, Rostom de Mello MA. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2006;31(6):731-6.

Mujika I, Padilla S, Pyne D, Busso T. Physiological changes associated with the pre-event taper in athletes. *Sports Med*. 2004;34 (13):891-927.

Pillis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uscilko H, Nazar K, Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol* 1993; 106A: 285-289.

Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1993 May;25(5):620-7.

Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med*. 1995, 20(4):251- 276.

Verkhoshansky, Y.V. *Entrenamiento Deportivo - Planificación y programación*. Barcelona, Ed. Martinez Roca, 1990.

Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35(11):1389-94.

10.7 APÊNDICE 7

Araujo GG, Papoti M, Delblin MA, Zanesco A, Gobatto CA. PERFORMANCE AND BIOMARKERS ADAPTATIONS DURING SWIMMING TRAINING BELOW THE ANAEROBIC THRESHOLD

ABSTRACT

The objective of the present study was to characterize the biomarkers adaptations in rats during 12 weeks of continuous training at intensities correspondent at 80% and 90% of anaerobic threshold evaluated individually by minimum lactate test. One hundred male Wistar rats (*Rattus Norvegicus Albinus*), 60 days old, weighing were using. The swimming training was preceded by 3 weeks of individual adaptation to the deep water environment consisting of 5-minute water (31 ± 1 °C) exposure daily, in cylindrical tanks (80 cm diameter×120 cm depth), subdivided into cylindrical compartments of 30 cm diameter×120 cm depth for individual swimming. Training protocol lasted 12 weeks with exercise sessions of 1 h/day, 6 days/week. The intensity of the training (% of body weight) was constant and based individually at 80% and 90% of anaerobic threshold measured by minimum lactate test (ML). Lots of ten rats were sacrificed before experimental period (Baseline) and every 4 weeks over 12 weeks of training. The general volume training not changed between training groups. The aerobic capacity (ML) in control reduced 23% after 12 Week in relation Baseline. The anaerobic performance decreased in training group and control in comparison to Baseline. The glycogen in gastrocnemius and soleus increased but the antioxidant activity (SOD, CAT and GPx) not changed during 12 weeks of experimental period. In conclusion, the ML showed an efficient protocol to control the training load but the supercompensation in glycogen stores not allowed increasing the aerobic and anaerobic performance after 12 weeks continuous endurance training. Also, the training not causes significant biomarkers alterations except in CK concentration after 8 weeks.

INTRODUCTION

The aerobic continuous training is a classical method to development the endurance capacity and is characterized without recovery times and constant overload (Carvalho et al., 2005). To support long periods of exercise, the intensity of effort should be between the zone of anaerobic threshold that enables to maintain over time without continual blood lactate accumulation (Gobatto et al., 2001).

From the determination of anaerobic threshold in rats (Pilis et al., 1993; Manchado et al., 2006), the training programs have prioritized moderate intensities to identify aerobic adaptations associated on pathology, nutrition and others interventions (Carvalho et al., 2005). Clearly, aerobic training programs can potentially induce physiological modification related ventricular enlargement, respiratory adaptations and oxidative enzymes thereby improving aerobic performance or responses intervention (Baldwin, 1977). However, the level of adaptations may be directly related to the intensity of exercise. Therefore, the individualized prescription of training load in rats is essential for standardization of physiological cause/effect and for an illness and others interventions.

In athletes, there are external influences that hinder the physiological parameters such as sleep, nutritional condition, emotional problems and others factors that may be avoided in experimental physiology. Our hypothesis is that the training applied at intensities below the anaerobic threshold in rats, results in negative biomarkers adaptations including an increase in aerobic performance. In this context, the objective of the present study was to characterize the physiological adaptations in rats during 12 weeks of continuous training at intensities correspondent at 80% and 90% of anaerobic threshold evaluated individually by minimum lactate test. Specifically, aerobic and anaerobic performance, biochemical (creatine kinase, glucose, urea, creatinine) hormonal responses (corticosterone and testosterone), glycogen stores (soleus, gastrocnemic and liver) and antioxidant enzymes (superoxide dismutase,

glutathione peroxidase and catalase) were evaluated every 4 weeks over 12 weeks of training.

METHODS

Animals

All experiments involving the animals were performed in accordance to the specific Brazilian resolutions on the Bioethics in Experiments with animals (law project no 93/08, approved in September 9th, 2008), that is in agreement to the guidelines of the American Society of Physiology (ASP) for research involving animals and to the European Convention for the protection of vertebrate animals used for Experimental and other scientific purposes.

One hundred male Wistar rats (*Rattus Norvegicus Albinus*), 60 days old, weighing 250-300g in the beginning of the experiment and 450-500g at the end were selected for this study. During the whole experiment, the animals received water and commercial chow (Labina-Purina[®]) *ad libitum* and were housed at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ with an inverted 12:12-h light-dark cycle (18:00-06:00 lights on). The swimming training was preceded by 3 weeks of individual adaptation to the deep water environment consisting of 5-minute water ($31\pm 1^{\circ}\text{C}$) exposure daily, in cylindrical tanks (80 cm diameter \times 120 cm depth), subdivided into cylindrical compartments of 30 cm diameter \times 120 cm depth for individual swimming.

Groups

The animals were separated in 3 groups:

- 1) Control Group (CG, n=40) \rightarrow Adaptation to the deep water (5 min, 2 days/week, without overload). Lots of ten rats of CG were sacrificed before experimental period (Baseline) and every 4 weeks over 12 weeks experimental period;
- 2) Exercise Group, 80% of anaerobic threshold (EG80, n=30) \rightarrow Training protocol lasted 12 weeks with exercise sessions of 1 h/day, 6 days/week. The intensity of the training (% of body weight) was constant and based individually at 80% of anaerobic threshold measured by minimum lactate test (ML). Lots of ten rats of EG80 were sacrificed before experimental period (Baseline) and every 4 weeks over 12 weeks of training;

3) Exercise Group, 90% of anaerobic threshold (EG90, n=30) → Training protocol lasted 12 weeks with exercise sessions of 1 h/day, 6 days/week. The intensity of the training (% of body weight) was constant and based individually at 90% of anaerobic threshold measured by minimum lactate test (ML). Lots of ten rats of EG90 were sacrificed before experimental period (Baseline) and every 4 weeks over 12 weeks of training.

The intensity of training (EG80 and EG90) was re-calculated weekly based on individual weight and last ML test. The training volume (min) was individually timed to each series for subsequent calculation of the week volume (Equation 1).

$$\text{Individual Volume (min)} = \sum \text{day minutes} / 6 \text{ days}$$

$$\text{Week General Volume (min)} = \square \text{ Individual Volume}$$

Equation 1. For determination of week general volume was calculated the individual volume.

Minimum Lactate Test (ML)

For determination of the aerobic and anaerobic performances before and after 12 week of experimental period, was utilized minimum lactate test (ML) which enables the determination of the aerobic and anaerobic parameters in a single protocol (Tegtbur et al., 1993; Voltarelli et al., 2002). This test consists in a first phase of hyperlactatemia induction (anaerobic) followed by incremental swimming intensity. The hyperlactatemia phase consisted of two swim bouts supporting overload of 13% of body weight (bw), both separated by a 1 min passive recovery. The first bout consisted of 30 s of exercise and second bout until exhaustion that was assumed when the animal was unable to stay on the water surface by 15 s (second bout time - $T_{lim13\%}$ - anaerobic parameter) (deAraujo et al., 2007). After hyperlactatemia induction, the animals were maintained shallow water to avoid thermal stress and blood samples of tail were collected at 7 and 9 minutes for lactate peak determination. The incremental phase of the test involved swimming with tethered loads (backpack lead)

equivalent to 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, and 7.0% individual bw. The stages in each load lasted 5 min and were separated by 30s for blood collection and lactatemia determination. The ML intensity (aerobic) was obtained from the equal zero derived of the second order polynomial fit for the lowest lactate value of the “U-shaped” curve of blood lactate concentration versus load of the incremental phase of the ML test. To calculate the ML intensity were selected animals that had R^2 above 0.80.

The lowest level in this curve theoretically represents the maximal exercise load in which the lactate production rate is the same as the lactate removal rate, i.e. it corresponds to the maximal lactate steady state, which is considered as the gold standard test in the aerobic capacity determination (deAraujo et al., 2007).

Biochemical Analyses

Lactate. For determination of the lactate concentrations, blood samples (25 μ L) were collected from rats' tail distal extremity, using of heparinized capillary tubes. Samples were transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes containing 50 μ L of sodium fluoride (1%). The blood samples were stored in freezer (- 20° C) during 1 week and lactate concentration was analyzed with an electrochemical analyzer (YSI 1500 Sport[®]).

Creatine Kinase, Creatinine, Urea and Glucose. Blood was collected by a cardiac puncture after thoracotomy, always 24 h after the end of the performance tests. The rats were anesthetized (Ketamine/Xylazine) and 6-8 milliliters of blood samples were collected for the glucose, creatine kinase, creatinine and urea analyses. Each blood sample without anticoagulant was centrifuged (5 min at 3500g). The supernatant were stored in freezer (- 20° C) during 1 week for duplicate analysis. The serum CK concentration was analyzed by "MPR3 CK NAC-active" kit (Boehringer Mannheim[®]). For creatinine and urea analyses, serum samples were added to kit (Boehringer Mannheim[®]) reagents to measurement *by*

spectrophotometric techniques. The levels of serum glucose were determined using glucose-oxidase colorimetric enzymatic method kit.

Glycogen Stores. White portion gastrocnemius, soleus and liver tissues were carefully dissected and maintained at -80°C until further analysis. The time of analysis, all tissues were rapidly thawed, minced into small pieces and homogenized with KOH 30%. The analyses of glycogen continued according to Dubois (7).

Hormonal and Antioxidant Analyses. Blood was collected with heparin anticoagulant and centrifuged by 15 minutes to plasma aliquots. The samples were stored in freezer (-70°C) during 1 week for duplicate analysis.

Corticosterone (Kit -Coat-A-Count Kit from Diagnostic Products Corporation—DPC[®]) and testosterone (Cayman Chemical, Testosterone ELISA Kit[®]).

Sulfhydryl Groups. The plasma (50 μL) was mixed in 1 mL of Buffer Tris-EDTA for first spectrophotometer analyses (412 nm). After, was added 20 μl of 5.5-*diotibis*-2-nitrobenzoic (DTNB) 10 mM, diluted in methanol and second spectrophotometer analyses was realized. The blank sample contained DTNB and Buffer Tris-EDTA. The Sulfhydryl Groups Total was calculated (first -second-blank) $\times 1,57\text{mM}$ using molar absorbance = $13.600\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Superoxide Dismutase (SOD) activity (U/mL) was determined using an EIA Cayman Chemical Assay Kit[®] and was used xanthin and xanthin oxidase method. The absorbance was 460 nm.

Glutathione Peroxidase (GPx) activity was determined using an EIA Cayman Chemical Assay Kit[®]. In the presence of glutathione reductase and NADPH, the oxidized glutathione is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NAD⁺. The decrease in absorbance at 340 nm was measured every 5 min.

Catalase activity (CAT) was measured using an EIA Cayman Chemical Assay Kit[®]. The sample was mixed in reagents kit (Buffer, Formaldehyde Standart, KOH, Methanol, hydrogen peroxide, potassium periodate). Absorbance at 540 nm.

Statistical Analyses

The dependent variables contained in all the steps were subjected to normality test using the W test of Shapiro-Wilk. For values obtained every 4 weeks and between training protocols (CG, EG80 and EG90) were applied analysis of variance Three-Way ANOVA followed when required by the post-hoc Newman Keuls test. For non-parametric samples, was used the Kruskal-Wallis followed by Dunn's method. The statistical significance was set at $P < 0.05$, and all data are presented as mean \pm standard deviation.

RESULTS

The average body weight at baseline and every 4 weeks of training are shown in Table 1.

Table 1. Body weight (g) before experimental period (Baseline), after 4, 8 and 12 weeks in Control (CG) and Exercise Groups (EG80 and EG90).

	CG		EG80		EG90	
Baseline (0 Week)	298.4	\pm 36.6	292.2	\pm 33.7	286.1	\pm 33.4
4 Week	372.7	\pm 38.4 ^A	350.7	\pm 36.2 ^A	356.8	\pm 37.1 ^A
8 Week	429.8	\pm 25.5 ^A	405.2	\pm 34.2 ^{A,B}	391.3	\pm 36.9 ^{*A}
12 Week	474.8	\pm 60.9 ^A	454.3	\pm 21.7 ^{A,B}	460.6	\pm 42.3 ^{A,B,C}

^A Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

^B Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 4 week.

^C Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 8 week.

* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CG in respective period.

The general volume training not changed between EG80 and EG90. However, the volume reduced after 7 week in comparison 2 week in EG80 (Figure 1).

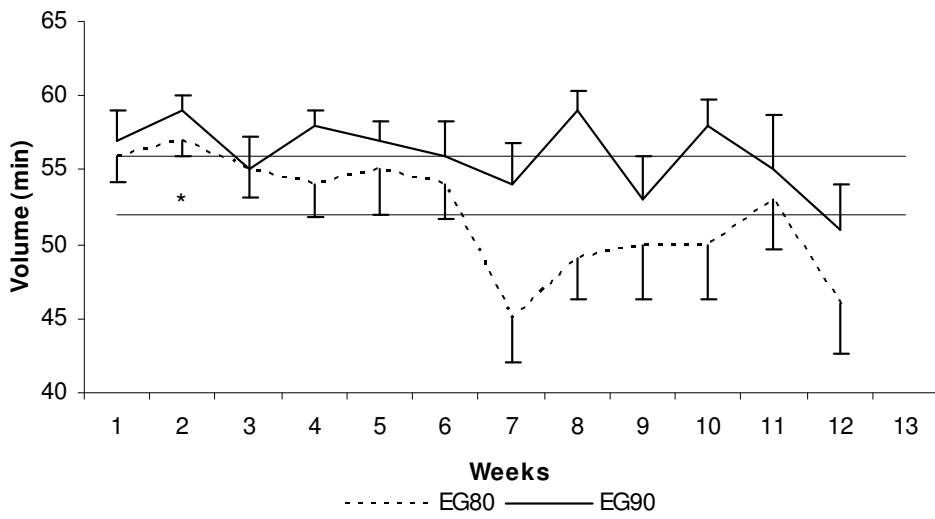


Figure 1. Volume (min) of exercise during 12 weeks of the training in EG80 and EG90.* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 7 week of EG80.

The total load of training was the product between volume (min) and intensity (% of LM) and showed reduced area in EG80 in comparison EG90 mainly after 6 weeks (Figure 2).

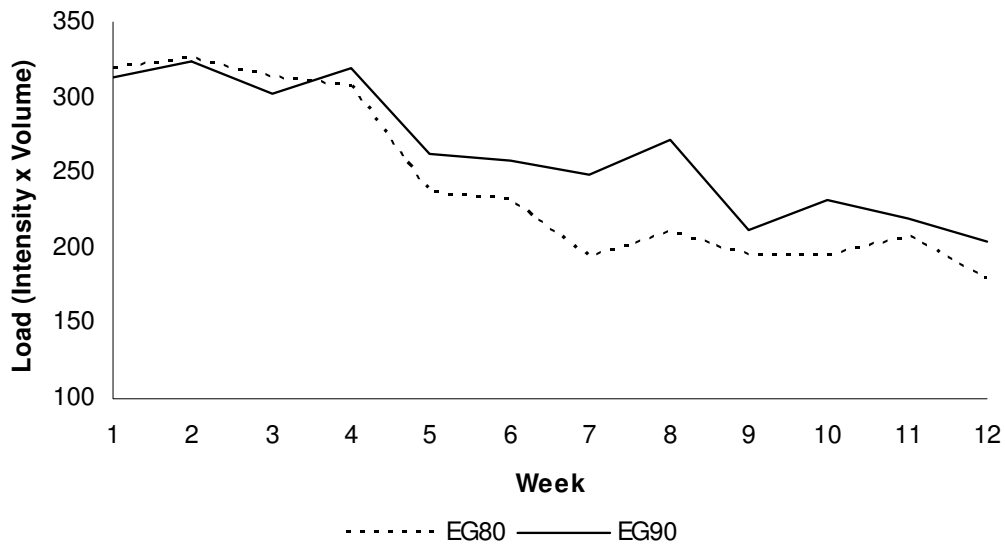


Figure 2. The total load (minutes x intensity) in each week of experimental period in EG80 and EG90.

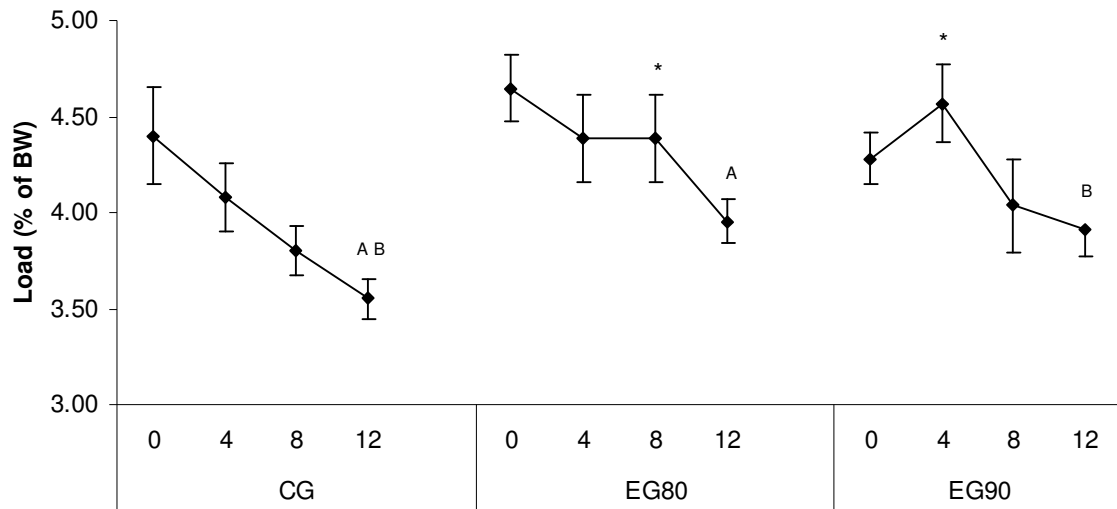


Figure 3. Load (% of BW) correspondent to ML in CG, EG80 and EG90 obtained in baseline period, 4, 8 and 12 Weeks.

^A Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week (Baseline).

^B Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 4 week.

* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CG in respective period.

The aerobic capacity (ML) in CG reduced 23% after 12 Week in relation Baseline (Figure 3).

The anaerobic performance (Tlim13%) decreased in EG and CG groups in comparison to 0 week. The CG after 12 week reduced 59% the Tlim13% in relation to 0 week. Reductions of 55% and 66% were found at the end of training compared to the initial weeks in EG80 and EG90 respectively (Figure 4).

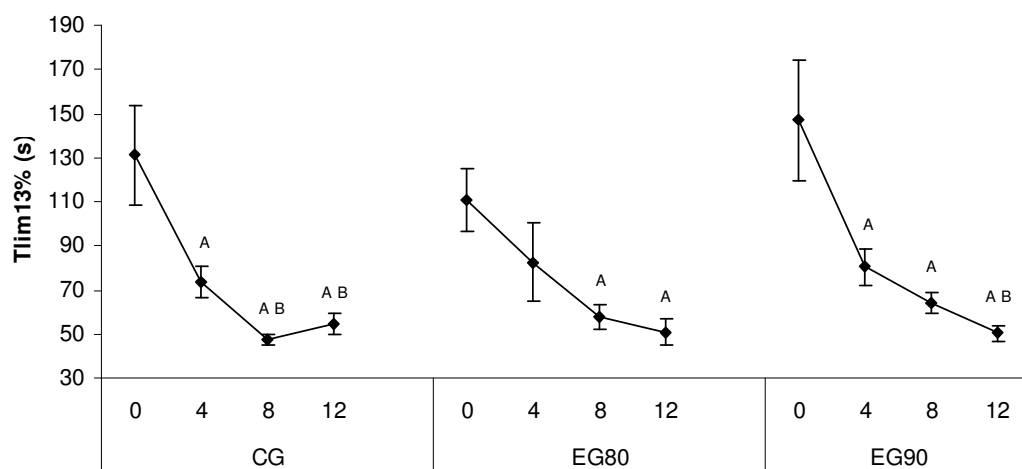


Figure 4. Values of Tlim13% (s) timed after exhaustion for hyperlactatemia induction during 12 Weeks in CG, EG80 and EG90.

^A Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week (Baseline).

^B Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 4 week.

The R^2 values not differ during 12 weeks in the experimental groups (Table 2). However, the % of success (R^2 above 0.80) increased in EG groups and reduced in CG (Table 2).

Table 2. R^2 values determined by second order polynomial fit for ML test. To calculate the ML intensity were selected animals that showed R^2 above 0.80.

	CG	EG80	EG90
0 Week (R^2)	0.94 ± 0.05	0.90 ± 0.09	0.88 ± 0.08
% of success	96% (n= 30)	80% (n=30)	75 % (n=30)
4 Week (R^2)	0.94 ± 0.07	0.91 ± 0.07	0.90 ± 0.09
% of success	73% (n= 30)	97% (n= 30)	100% (n= 30)
8 Week (R^2)	0.90 ± 0.14	0.92 ± 0.09	0.96 ± 0.06
% of success	46% (n= 20)	89% (n= 20)	87% (n= 20)
12 Week (R^2)	0.94 ± 0.08	0.95 ± 0.05	0.95 ± 0.03
% of success	50% (n= 10)	66% (n= 10)	71% (n= 10)

There was no difference in peak lactate at the end of Tlim13% no changed between the EG groups and CG (Table 3).

Table 3. Peak lactate values (mmol/L) obtained in recovery after hyperlactatemia induction (Tlim13%) in experimental period.

	CG	EG80	EG90
0 Week	5.85 ± 0.99	6.37 ± 0.77	5.42 ± 0.98
4 Week	7.17 ± 1.05	6.89 ± 0.89	7.20 ± 0.89
8 Week	6.29 ± 1.4	6.06 ± 0.98	7.05 ± 0.99
12 Week	7.52 ± 0.60	7.00 ± 0.74	6.75 ± 0.74

The figure 4 and 5 shows that glycogen concentration in the white portion of the gastrocnemius and in the soleus after 12 weeks of endurance training had significant differences. The glycogen in gastrocnemius increased approximately 102% in EG80 and EG90 after 12 weeks (Figure 5). The glycogen stores in soleus (12 Week) increased 45% and 51% in EG80 and EG90 in comparison CG respectively (Figure 6).

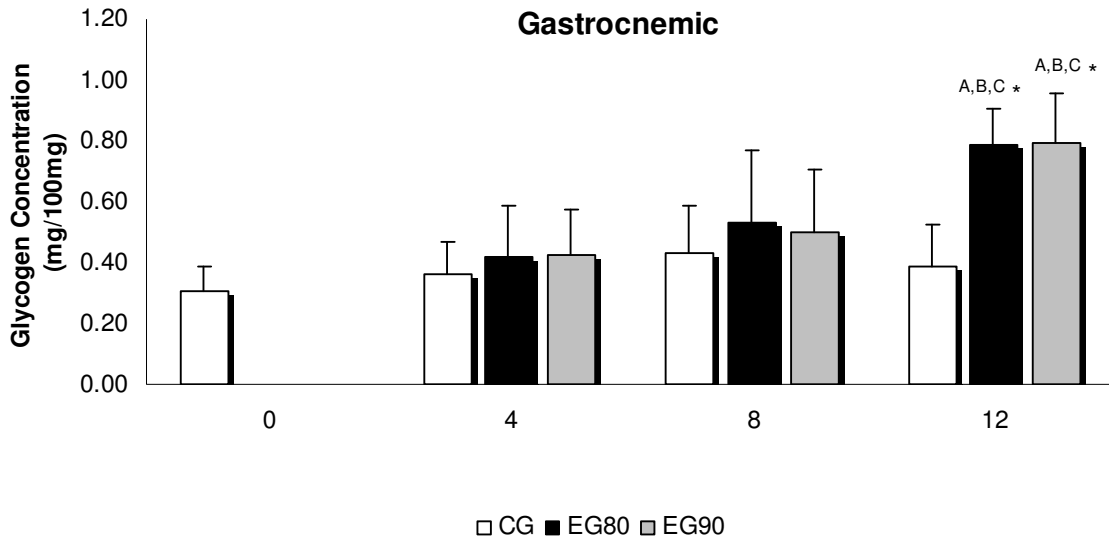


Figure 5. Glycogen Stores in white portion of gastrocnemius muscle in 0, 4, 8 and 12 weeks of experimental period in CG, EG80 and EG90.

^A Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week (Baseline).

^B Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 4 Week.

^C Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 8 Week.

* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CG.

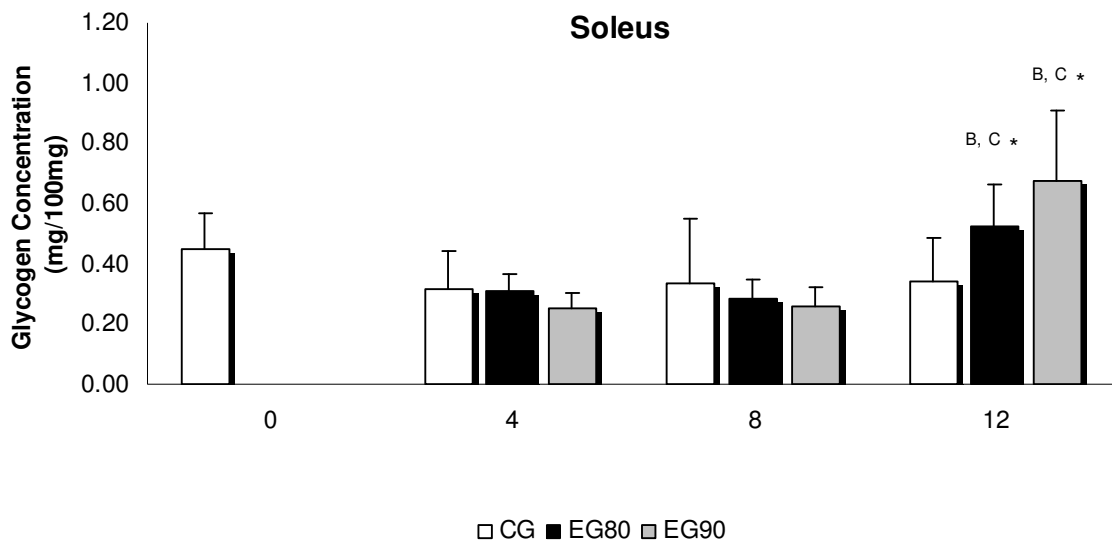


Figure 6. Glycogen Stores in Soleus Muscle in 0, 4, 8 and 12 weeks of experimental period in CG, EG80 and EG90.

^B Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 4 Week.

^C Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 8 Week.

* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CG.

Table 3 shows that glycogen concentration (liver) after 12 weeks of endurance training had remarkable differences only in EG80.

Table 3. Values of glycogen concentration (mg/100mg) of the liver during experimental period in the groups CG and EG.

	CG	EG80	EG90
0 Week (Baseline)		2.39 ± 1.11	
4 Week	2.88 ± 0.77	3.09 ± 0.70	3.03 ± 0.81
8 Week	2.66 ± 0.55	3.26 ± 0.84	3.37 ± 0.79
12 Week	3.47 ± 1.06	5.79 ± 1.31 ^{A, B, C *}	3.98 ± 1.16 [#]

^A Significant differences (P<0.05) in relation to 0 week (Baseline).

^B Significant differences (P<0.05) in relation to 4 Week.

^C Significant differences (P<0.05) in relation to 8 Week.

* Significant differences (P<0.05) in relation to CG in respective period.

Significant differences (P<0.05) in relation to EG80 in respective period.

The antioxidant activity (SOD, CAT and GPx) did not change during the 12 weeks of experimental period. The Sulfhydryl Groups increased after 8 Week in EG80 and EG90 compared to CG (Table 4).

Table 4. The antioxidant activity (SOD, CAT, GPx) and Sulfhydryl Groups during 12 weeks of experimental period.

	CG	EG80	EG90
SOD (U/mL)			
0 Week (Baseline)		31.9 ± 8.2	
4 Week	36.0 ± 4.3	30.0 ± 3.3	29.9 ± 5.0
8 Week	33.0 ± 2.4	34.9 ± 4.0	32.9 ± 2.8
12 Week	35.6 ± 5.1	34.6 ± 5.7	34.4 ± 4.1
GPx (nmol/min/mL)			
0 Week (Baseline)		298 ± 35	
4 Week	304 ± 25	323 ± 54	314 ± 45
8 Week	321 ± 47	339 ± 46	332 ± 93
12 Week	351 ± 56	421 ± 138	393 ± 62
CAT (U/mL)			
0 Week (Baseline)		4.1 ± 0.5	
4 Week	5.4 ± 0.9	5.8 ± 0.9	8.5 ± 1.2
8 Week	5.1 ± 0.9	9.0 ± 1.8	7.6 ± 2.9
12 Week	5.9 ± 0.7	8.6 ± 1.3	6.5 ± 1.2
Sulfhydryl Groups (µM)			
0 Week (Baseline)		551 ± 31	
4 Week	485 ± 142	523 ± 107	640 ± 117
8 Week	356 ± 100	548 ± 225*	651 ± 183*
12 Week	449 ± 39	609 ± 222*	637 ± 161*

* Significant differences (P<0.05) in relation to CG in respective period.

The CK concentration was higher in EG80 (54%) and EG90 (131%) after 8 Week of training than CG 8 week. The CK in EG80 and EG90 after 12 Week reduced (Figure 7).

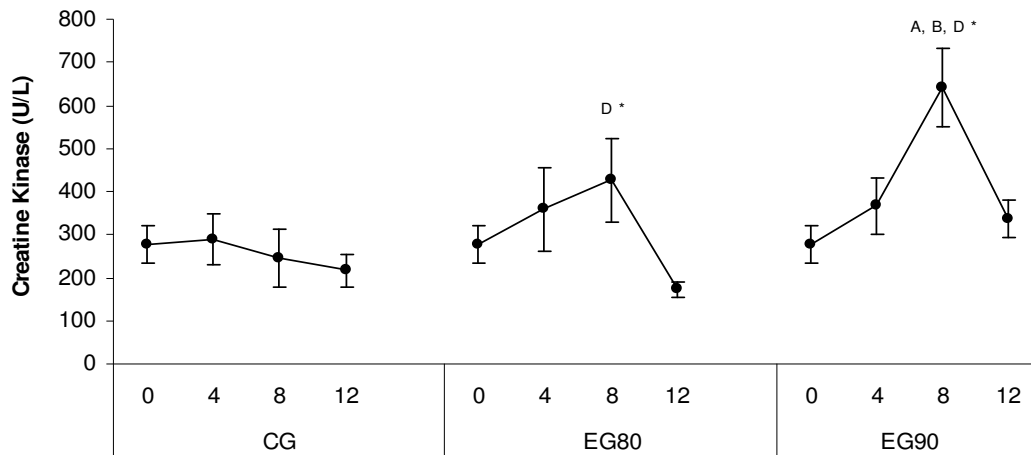


Figure 7. Creatine Kinase (CK) concentration (U/L) during experimental period in 0, 4, 8 and 12 Week in CG, EG80 and EG90.

^A Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week (Baseline).

^B Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 4 Week.

^D Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 12 Week.

* Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CG in respective period.

Table 5 shows the serum concentrations of creatinine and urea. No changes in these metabolites were found. Besides, the testosterone concentrations did not changed during 12 weeks but the concentration of corticosterone increased only at 12 weeks of training for the group EG90 than EG80 and CG in the same period (Table 5).

Table 5. Serum concentrations of creatinine, urea, testosterone and corticosterone in baseline (0 week) and after 4, 8 and 12 week of training in CG, EG80 and EG90.

	CG	EG80	EG90
Creatinine (mg/dL)			
0 Week (Baseline)		0.71 ± 0.13	
4 Week	0.64 ± 0.11	0.84 ± 0.30	0.83 ± 0.26
8 Week	0.63 ± 0.13	0.69 ± 0.16	0.62 ± 0.11
12 Week	0.68 ± 0.11	0.71 ± 0.09	0.75 ± 0.12
Urea (mg/dL)			
0 Week (Baseline)		50.4 ± 4.75	
4 Week	52.6 ± 13.0	51.5 ± 18.8	61.2 ± 17.6
8 Week	55.5 ± 14.2	60.5 ± 11.0	60.1 ± 20.2
12 Week	53.1 ± 5.9	51.8 ± 9.1	52.3 ± 9.2
Testosterone (ng/mL)			
0 Week (Baseline)		2.82 ± 0.72	
4 Week	3.79 ± 1.16	2.65 ± 1.15	2.41 ± 0.56
8 Week	3.04 ± 0.82	3.22 ± 1.40	3.56 ± 0.94
12 Week	2.63 ± 0.62	2.10 ± 0.60	1.88 ± 0.65
Corticosterone (ng/mL)			
0 Week (Baseline)		370 ± 55	
4 Week	335 ± 48	373 ± 55	428 ± 73
8 Week	315 ± 52	324 ± 80	370 ± 54
12 Week	362 ± 44	372 ± 44	539 ± 54 ^{* #}

^{*} Significant differences (P<0.05) in relation to CG in respective period.

[#] Significant differences (P<0.05) in relation to EG80 in respective period.

DISCUSSION

Minimum lactate test is a method usually employed for the prediction of the anaerobic threshold (% bw) and anaerobic ($T_{lim13\%}$) parameters in a single protocol (Tegtbur et al., 1993). In present study, the ML was applied every 4 weeks showing high R^2 values along experimental period (Voltarelli et al., 2002; deAraujo et al., 2007). The training load was individually re-calculated and based in last ML test to keep precisely the zone of 80 and 90% of ML. Besides, the increased % success in training groups shows protocol sensibility and homogeneous responses in EG.

The results of present study confirm partially the hypothesis that endurance training below anaerobic threshold can improve aerobic performance. Eventhough the training did not improve the ML load, the EG80 and EG90 attenuated the aerobic loss in comparison sedentary group. This phenomenon can be considered positive because the aerobic capacity in CG showed a natural decrease in comparison baseline values. Besides, the long-term housed in cages imposed inactivity to CG and accelerated the reduction in aerobic and anaerobic systems.

In relation anaerobic performance, reduction of $T_{lim13\%}$ in EG80 and EG90 was expected due to high volume of training that leads to reduction of the anaerobic characteristics (type II muscle fibers, glycolytic enzymes) (Costill et al., 1991). However, a interesting results were that glycogen stores (gastrocnemic and soleus) had supercompensation after training but did not translate is energetic gain to performance. Possibly, the long-period of aerobic training stimulates glycogen synthesis but does not allow an efficient glycogenolysis and hyperlactatemia (Lehmann et al., 1992; Foster, 1998). In part, this physiological limitation to cleave glycogen can be seen by unaltered lactate concentration after anaerobic session. However, other specific analyses (glycogen synthase *a-b*, fosforilase *a-b*, Lactato Desidrogenase, Muscle Triglycerides) are necessary to evidence this phenomenon.

The volume training had a target time of 60 min but the total averages in EG80 and EG90 were 52 and 56 min respectively. The volume in EG80 remained above the overall average until 6 weeks, with subsequent fall to the end of training. The EGs had the volume oscillating near the general average over 12 weeks. These natural oscillations show that, after periods of reduced volume, the swimming time increases again. Possibly, this natural increase/decrease in volume occurred due to a spontaneous recovery required to support the next series. Therefore, just as in humans, it is necessary to develop a specific training programs with periods of recovery and variation between volume/intensity in order to create different cellular and enzymatic adaptations in rats (Issurin, 2008).

In an attempt identify overtraining, innumerous biochemical tests are utilized to characterize physiological adaptations. For the characterization of overtraining in rats (Hohl et al., 2009), the application of training protocols become an important tool because of the efficient control of physiological variables. In the present study, the serum CK concentration was the main enzymatic adaptation in addition to performance and glycogen stores (Brancaccio et al., 2008). The serum CK concentration indicates muscle damage after 8 week of training that corresponds the moment of high volume training (Figure 1).

However, this increase after 8 week was not accompanied by antioxidant enzymes, hormonal concentration and other biochemical alterations. The CK concentration showed a sensitive biomarker in training but other studies are necessary to correlate the training volume with muscle damage.

In relation antioxidant enzymes, previous studies have reported that different intensities of effort generate different antioxidant enzyme responses (Miyazaki et al., 2001; Scheneider et al., 2005). Jenkins et al. (1993) showed that 2-5% of oxygen uptake originates reactive oxygen species which is maximized by exercise. On the other hand, changes to the oxidant/antioxidant balance induced by exercise may result in increased antioxidant capacity,

which may balance the enhanced generation of reactive oxygen species (ROS) and associated oxidative stress (Tanabe et al., 2006). However, unchanged antioxidant activity shows the inefficient aerobic stimulus (Below anaerobic threshold) to originate ROS in intensities below anaerobic threshold as a consequence of low mitochondrial activity (Holloszy, 1967; Inoue et al., 2003). Therefore, the oxidative attack evaluated by sulfhydryl groups after 8 and 12 week in EG80 and EG90, was not sufficient to increase an endogenous response (Olinescu et al., 1995).

During prolonged exercise, the hormones regulation sustains the availability of energy substrates, provided cortisol, growth hormone (GH), glucagon, catecholamines and other hormone (Inder et al, 1998). Testosterone is an anabolic steroid and increases the protein synthesis and deposition of glycogen in the muscles during recovery from exercise (Halson and Jeukendrup, 2004). In contrast, cortisol is a catabolic hormone, inducing lipolysis and proteolysis, with increased hepatic glycogenesis and elevated blood glucose. In the present study, the plasma testosterone not increased the plasma circulation but the corticosterone increased its concentration after 12 week in EG90. Flynn et al. (1994) examined the blood hormone (testosterone and cortisol) responses during a season of competitive runners and swimmers and verified that large changes in volume of training were required to show significant changes in these parameters.

In conclusion, the supercompensation in glycogen stores not allowed increasing the aerobic and anaerobic performance after 12 weeks. Besides, the ML showed an efficient protocol to control the training load showing notable polynomial adjustment (R^2). Also, the long period of training (12 weeks) did not promote significant gains in the aerobic capacity and reduced the total load from 4 week. The aerobic capacity increased in 4 weeks for EG90 and was unchanged until 8 weeks in EG80. The continuous endurance training below anaerobic threshold did not cause significant biomarkers alterations except in CK

concentration after 8 weeks. However, other studies with different analyses and training programs are necessary to elucidate the training adaptations in rats.

REFERENCES

Baldwin KM, Cooke DA, Cheadle WG. Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 42(2): 267-272, 1977.

Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull.* 2007;81-82:209-30.

Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FA. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;140(4):409-13.

Costill DL, Thomas R, Robergs RA, Pascoe D, Lambert C, Barr S, Fink WJ. Adaptations to swimming training: influence of training volume. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23(3):371-7.

deAraujo GG, Papoti M, Manchado Fde B, de Mello MA, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;148(4):888-92.

Flynn MG, Pizza FX, Boone JRBJ, Abdres FF, Michaud TA, Rodrigues-Zayas JR. Indices of training Stress During Competitive Running and Swimming Seasons. *Int J Sports Med* 1994;15:21-26.

Foster C. Monitoring training in athletes with reference to overtraining syndrome. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30(7):1164-8

Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;130(1):21-7.

Halson SL, Jeukendrup AE. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med* 2004;34: 967-81.

Hohl R, Ferraresso RL, De Oliveira RB, Lucco R, Brenzikofer R, De Macedo DV. Development and characterization of an overtraining animal model. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(5):1155-63.

Holloszy, J.O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *Journal Biology Chemistry*, v.10;242(9), p.2278-82, 1967.

Inder WJ, Hellems J, Swanney MP, Prickett TC, Donald RA Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes. *J Appl Physiol.* 1998;85(3):835-41.

Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem.* 2003;10(23):2495-505.

Issurin V. Block periodization versus traditional training theory: a review. *J Sports Med Phys Fitness.* 2008 ;48(1):65-75.

Jenkins RR. Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr.* 1993;3(4):356-75.

Lehmann M, Gastmann U, Petersen KG, Bachl N, Seidel A, Khalaf AN, Fischer S, Keul J. Training-overtraining: performance, and hormone levels, after a defined increase in training volume versus intensity in experienced middle- and long-distance runners. *Br J Sports Med* 1992: 26: 233-42.

Manchado Fde B, Gobatto CA, Voltarelli FA, Rostom de Mello MA. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006;31(6):731-6.

Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2001;84(1-2):1-6.

Olinescu R, Talaban D, Nită S, Mihăescu G. Comparative study of the presence of oxidative stress in sportsmen in competition and aged people, as well as the preventive effect of selenium administration. *Rom J Intern Med*. 1995;33(1-2):47-54.

Pillis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uscilko H, Nazar K, Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol* 1993; 106A: 285-289.

Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Belló-Klein A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol*. 2005;30(6):723-34.

Tanabe K, Masuda K, Hirayama A, Nagase S, Kono I, Kuno S. Effect of spontaneous exercise on antioxidant capacity in rat muscles determined by electron spin resonance. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006;186(2):119-25.

Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1993 May;25(5):620-7.

Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35(11):1389-94.

10.8 APÊNDICE 8

deAraujo GG, Papoti M, Reis IGM, Mello MAR, Gobatto CA. PHYSIOLOGICAL ADAPTATIONS IN RATS SUBMITTED A ANAEROBIC INTERMITTENT TRAINING

ABSTRACT

To characterize the anaerobic and aerobic performances before and after anaerobic intermittent training (AIT) beyond to describe the biomarkers responses using biochemical. Fifty male Wistar rats (*Rattus Norvegicus*), 60 days old were selected for this study. The experiment was preceded by 2 weeks of individual adaptation to the deep water environment. The animals were separated in two groups: anaerobic intermittent training (AIT) and sedentary/control (CT). For determination of the aerobic and anaerobic performances before and after each period (0, 6 and 12 weeks), it was utilized lactate minimum test (LM) which enables the determination of the aerobic and anaerobic parameters in a single protocol. The aerobic capacity evaluated by LM in AIT increased approximately 30% after 12 week in relation CT. T_{lim} unchanged in AIT during training but showed high values than CT after 6 and 12 week. The glycogen stores remained in CT group but in AIT increased. The AIT group the glycogen stores in liver increased only in 12 week. The corticosterone concentration in AIT increased after 6 week and reduced after 12 week in comparison CT. In conclusion, AIT improved the aerobic performance that is interconnected with energetic supercompensation (muscle glycogen stores) and maintained of biomarkers analyses avoiding overtraining.

INTRODUCTION

From the determination of anaerobic threshold and maximal oxygen uptake in rats, the exercise in experimental physiology became an important method to simulate physical stress adaptations as observed in humans (Pilis et al., 1993; Gobatto et al., 2001). Thereby, most studies use aerobic exercise as a method of intervention in diseases, diets, medicines and others (Mello, 1994; Oliveira et al., 2007). Infact, aerobic training potentially induces respiratory enzyme adaptations, ventricular enlargement, myofibril ATPase thereby improving aerobic performance (Baldwin, 1985; Carvalho et al., 2005). Therefore, few researches use experimental physiology to analyze precisely the anaerobic training adaptations since the physiological responses to exercise is similar to humans.

In treadmill, even with inclination and velocity, the application of anaerobic series in rats is impracticable due to biomechanical limitation to reach high velocities. The treadmill exercise did not reache hyperlactatemia in comparison to swimming exercise (Voltarelli et al., 2002; Manchado et al., 2005). Therefore, the anaerobic training in rats is used less frequently than aerobic protocols due to difficulty of control and anaerobic intensities prescription.

The strength/power training is an important system of signaling to a multitude of target cells allowing aerobic adaptation besides anaerobic (Kramer et al., 2002). Currently, studies in humans have shown that resistance training can improve aerobic performance (Minahann and Wood, 2008). Therefore, our hypothesis is that anaerobic intermittent training improves the anaerobic and aerobic performances causing positive adaptation in training biomarkers. The present study was designed to characterize the anaerobic and aerobic performances before and after anaerobic intermittent training as well as to describe the training biomarkers responses using biochemical (creatinine, uric acid, urea, creatine kinase, lactate dehydrogenate, catalase, superoxide dismutase), hormonal analyses (testosterone and corticosterone) and glycogen stores (liver, soleus and gastrocnemic).

METHODS

Animals

All experiments involving the animals were performed in accordance to the specific Brazilian resolutions on the Bioethics in Experiments with animals (law project no 93/08, approved in September 9th, 2008), that is in agreement to the guidelines of the American Society of Physiology (APS) for research involving animals and to the European Convention for the protection of vertebrate animals used for Experimental and other scientific purposes.

Fifty male Wistar rats (*Rattus Norvegicus*), 60 days old, weighing 250-300g in the beginning of the experiment and 450-500g at the end were selected for this study. During the whole experiment, the animals received water and commercial chow (Labina-Purina[®]) *ad libitum* and were housed in collective cages (5 animals per cage), in a room with a light cycle from 06.00am to 6.00pm, at 25°C.

The experiment was preceded by 2 weeks of individual adaptation to the deep water environment consisting of 5-minute water exposure daily, 5 days a week in cylindrical tanks (80 cm diameter×120 cm depth), subdivided into cylindrical compartments of 30 cm diameter×120 cm depth for individual swimming filled with water at 31±1 °C.

The animals were separated in two groups: anaerobic intermittent training (AIT) and sedentary/control (CT). Twenty rats were allocated to AIT group and 30 rats in CT group. Ten rats of CT were sacrificed before the start of training period (baseline, 0 week) and the remaining (n=20), in lots of 10, after 6 weeks and 12 weeks in rest. The rats of AIT (n=20) were sacrificed in lots of 10, 24 hours after the last session of 6 weeks and 12 weeks of training (Figure 1).

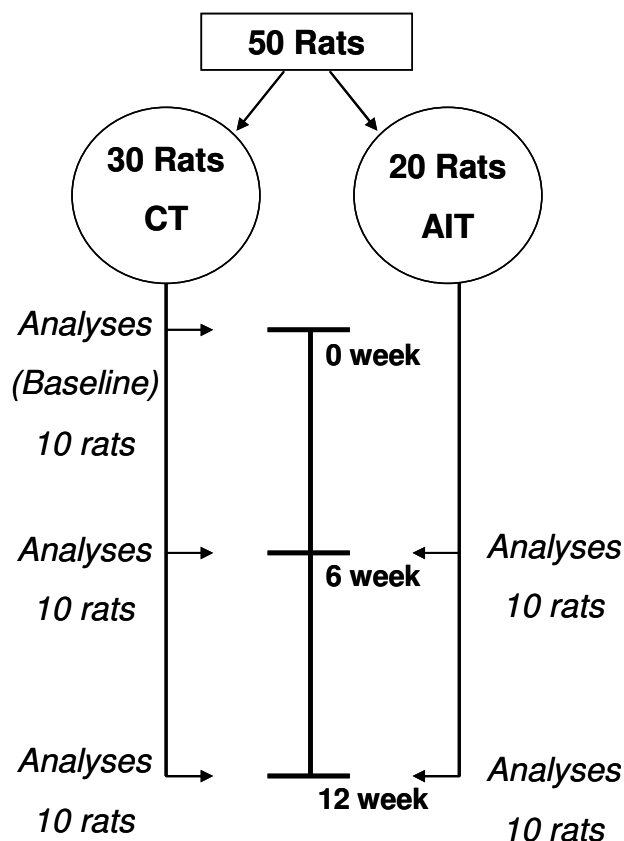


Figure 1. Timeline of analyses in baseline (0 week), after 6 and 12 weeks for control group (CT) and anaerobic intermittent training (AIT). Rats sacrificed for blood collection, muscle and tissues assays. The anaerobic and aerobic performances were evaluated by lactate minimum test.

Performance Evaluation- Lactate Minimum Test

For determination of the aerobic and anaerobic performances before and after each mesocycle, the was utilized lactate minimum test (LM) which enables the determination of the aerobic and anaerobic parameters in a single protocol (deAraujo et al., 2007). The LM consists primarily of hyperlactatemia induction phase (Exhaustion Time – T_{lim}) followed by a 9-minute recovery before incremental swimming exercise. During this interval, the animals were maintained shallow water to avoid thermal stress and blood samples were collected at 7 and 9 minutes for lactate peak determination. The incremental phase of the test involved swimming with workloads at 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 and 6.5% of body weight (BW) for 5 minutes in each one. The stages were separated by 30s for blood collection and lactatemia determination. The LM were obtained from derived equal zero of the second order

polynomial fit (ZF) for the lowest lactate value of the “U-shaped” curve of blood lactate concentration versus load of the incremental phase of the LM test (deAraujo et al., 2007).

Anaerobic Intermittent Training (AIT)

The AIT lasted 12 week with exercise sessions of 6 days/week. The load of the training was based in percentage of body weight (% of bw) calculated individually every week. The intensity of training was equivalent to 50% of bw and was divided in 4 series of 10 jumps with 30 s of recovery among series.

Biochemical Analyses

Lactate Concentration. The blood samples (25 μ L) collected from the animals during exercise tests were placed in microtubes (1.5 mL) containing 50 μ L of 1% sodium fluoride which were stored in freezer for later lactate concentration analysis in YSI model 1500 SPORT lactate analyzer.

Glycogen Stores. Gastrocnemics, soleus muscles and liver excision, aimed at glycogen dosage (Dubois et al., 1956).

Enzymes and metabolites. The serum creatine kinase and lactate dehydrogenase concentration, creatinine, uric acid and urea were analyzed by commercial Kit from Boehringer Mannheim[®].

Hormones. Concentration of Corticosterone (Kit -Coat-A-Count Kit from Diagnostic Products Corporation—DPC[®]) and testosterone (Cayman Chemical, Testosterone ELISA Kit[®]).

Sulfhydryl Groups, Catalase and Superoxide Dismutase. For sulfhydryl groups, the plasma (50 μ L) was mixed in 1 mL of Buffer Tris-EDTA for first spectrophotometer analyses (412 nm). After, was added 20 μ l of 5.5-*diotibis*-2-nitrobenzoic (DTNB) 10 mM, diluted in methanol and was realized second spectrophotometer analyses. The blank sample contained DTNB and Buffer Tris-EDTA. The Sulfhydryl Groups Total was calculated (first -second-blank) x 1,57mM using molar absorbance= 13.600 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Catalase (CAT) and Superoxide

Dismutase (SOD) activity (U/mL) was measured using an EIA Cayman Chemical Assay Kit[®]. The reagents kit (Buffer, Formaldehyde Standart, KOH, Methanol, hydrogen peroxide, potassium periodate) for CAT was mixed and spectrophotometer analyses at 540 nm. For SOD activity, was used xanthin and xanthin oxidase method. The absorbance was 460 nm.

Statistical Analyses

The dependent variables contained in all the steps were subjected to normality test using the W test of Shapiro-Wilk. Therefore, the analysis of variance (ANOVA two-way) with Newman–Keuls' post hoc was used for averages comparisons in each week (0, 6 and 12 weeks). For non-parametric samples, was used the Kruskal-Wallis followed by Dunn's method. The statistical significance was set at $P < 0.05$, and all data are presented as mean \pm standard deviation.

RESULTS

The aerobic capacity evaluated by LM in AIT increased approximately 30% after 12 week in relation CT. The intensity of LM decreased with age after 6 and 12 weeks in CT (Figure 2).

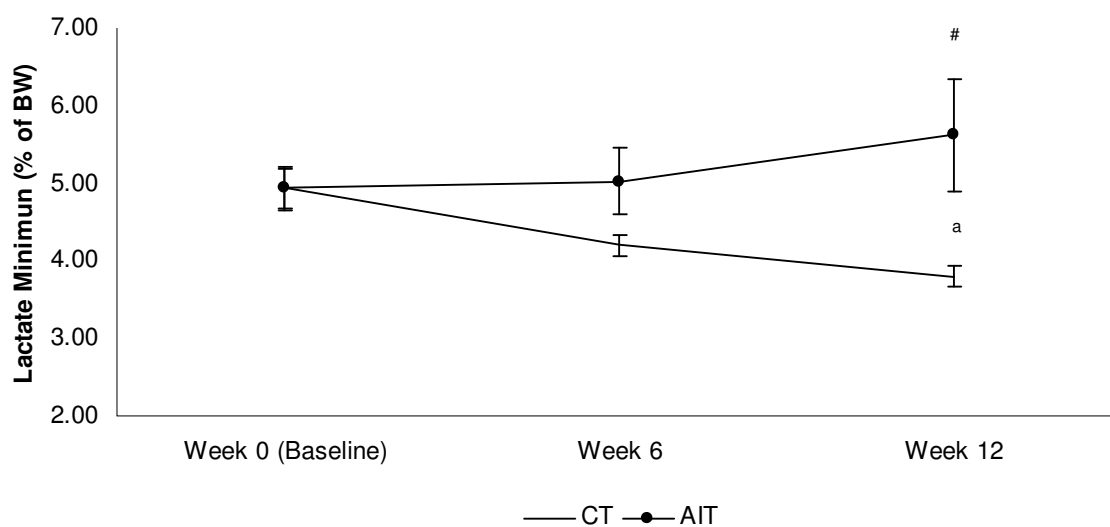


Figure 2. Aerobic capacity measured by Lactate minimum test in each period of training (0 week – baseline, 6 week and 12 week). The intensity of lactate minimum test was determined by % of the body weight (bw) in CT and AIT group.

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

[#] Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CT group in respective period.

Tlim was unchanged in AIT during training but showed higher values than CT after 6 and 12 weeks. Also, the anaerobic capacity decreased in CT group when compared with baseline (0 week) (Figure 3).

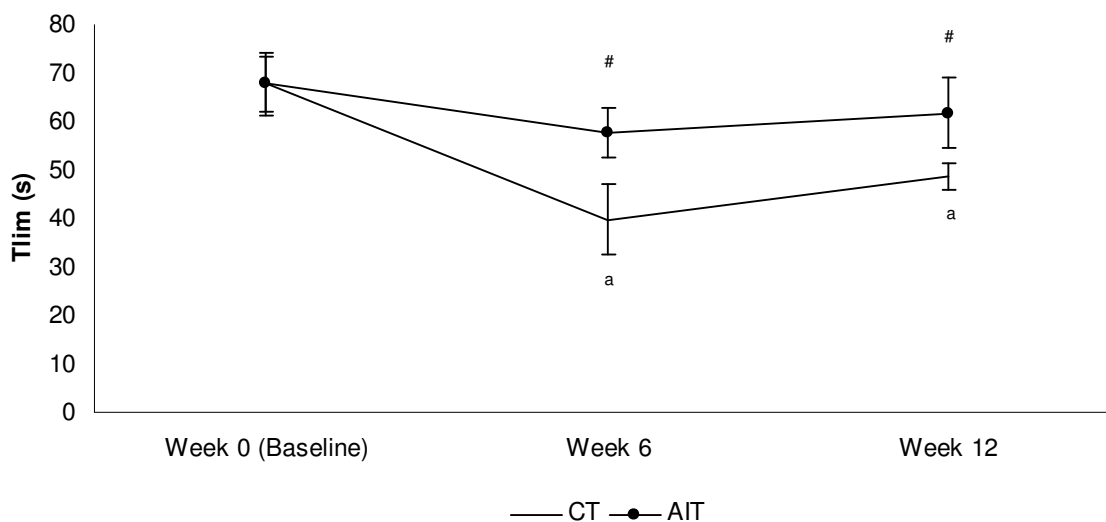


Figure 3. Exhaustion time (Tlim - s) at anaerobic intensity of 13% of bw during the hyperlactatemia phase of the lactate minimum test.

^a Significant differences (P<0.05) in relation to 0 week.

[#] Significant differences (P<0.05) in relation to CT group in respective period.

The lactate production was unchanged in CT but increased in AIT after 6 week in comparison baseline (Table 1).

Table 1. Peak Lactate (mmol/L) after hyperlactatemia phase in baseline, after 6 week and 12 week in CT and AIT group.

	0 Week (Baseline)	6 Week	12 Week
CT	5.53 ± 0.38	5.60 ± 0.47	6.29 ± 0.46
AIT		6.89 ± 0.40 ^a	6.23 ± 0.31

^a Significant differences (P<0.05) in relation to 0 week.

Glycogen concentration increased in gastrocnemius CT group after 6 (95%) and 12 week (91%) in comparison to baseline values. The AIT group increased 182% the glycogen stores after 12 weeks in relation baseline and 44% in comparison AIT 6 week (Figure 4).

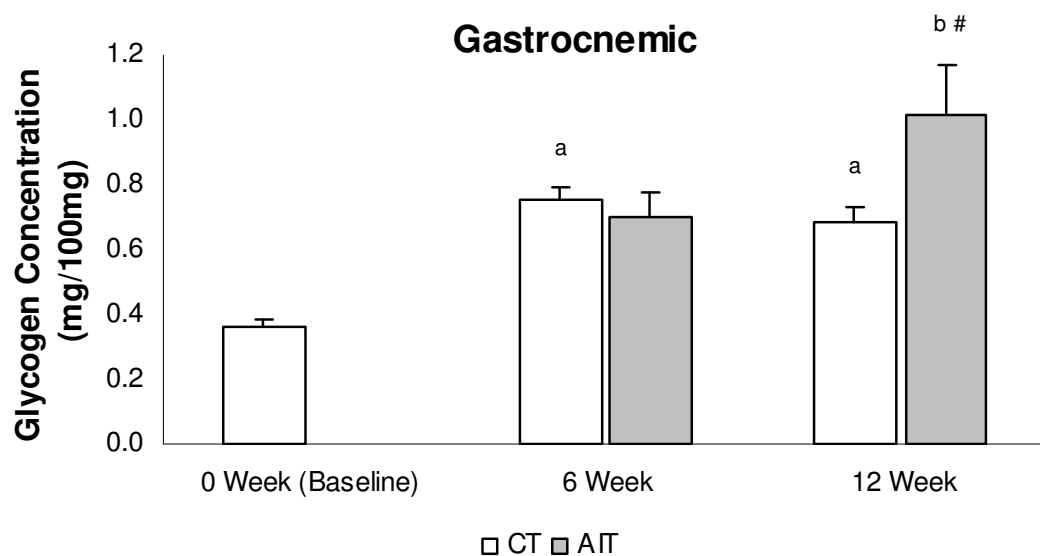


Figure 4. Values of glycogen concentration in gastrocnemius muscle analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week and 12 week in control (CT) and anaerobic intermittent training (AIT). ^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week. ^b Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 6 week. [#] Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CT group in respective period.

In soleus muscles, the glycogen stores remained in CT group but in AIT increased 75% after 6 week and 69% after 12 weeks in comparison CT group (Figure 5).

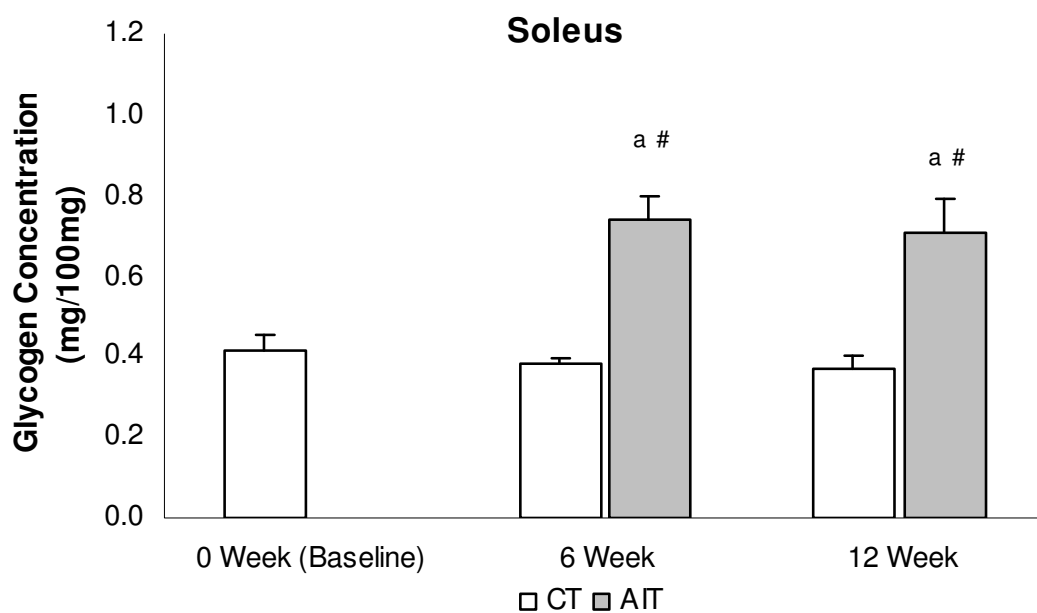


Figure 5. Values of glycogen concentration in soleus muscle analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week and 12 week in control (CT) and anaerobic intermittent training (AIT).

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

[#] Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CT group in respective period.

The glycogen concentration in liver increased after 6 and 12 week in CT group in comparison baseline. However, for AIT group the glycogen stores in liver increased only in 12 week (Figure 6).

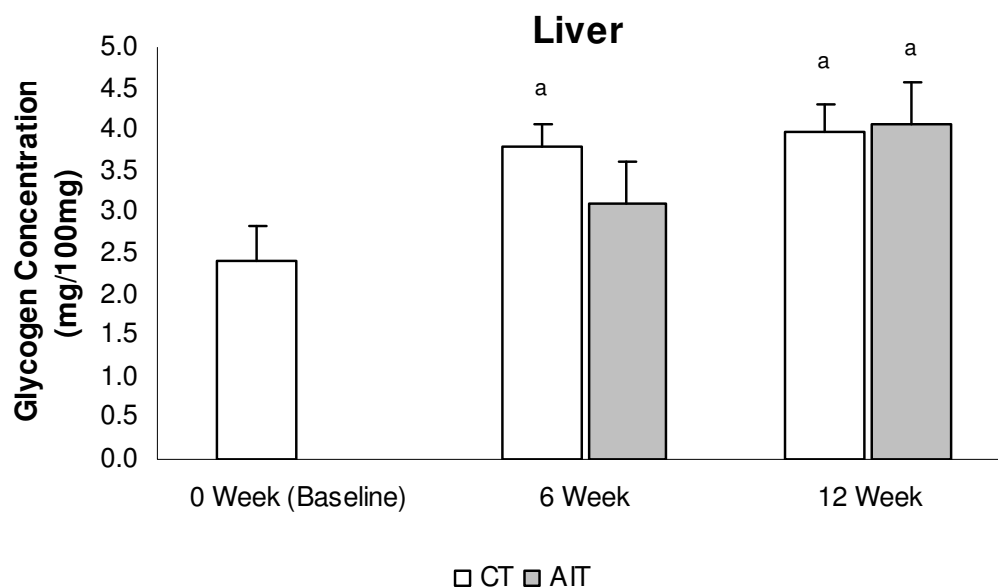


Figure 6. Values of glycogen concentration in liver analyzed after 0 week (Baseline Values), 6 week and 12 week in control (CT) and anaerobic intermittent training (AIT).

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

The lactate dehydrogenate concentration remained unchanged in CT group and AIT group but, creatine kinase decreased specially after 12 week in relation 0 week (Table 2).

Table 2. Creatine kinase and lactate dehydrogenate concentration analyzed 24 hours after last session training in 0 week (baseline), 6 week and 12 week in control (CT) and anaerobic intermittent training (AIT) groups.

	0 Week (Baseline)	6 Week	12 Week
Creatine Kinase (U/L)			
CT		118.2 ± 23.9	115.4 ± 21.7
AIT	159.5 ± 24.2	131.1 ± 21.48	89.7 ± 8.38 ^a
Lactate Dehydrogenate (U/L)			
CT		71.7 ± 8.9	93.5 ± 15.1
AIT	98.4 ± 15.06	88.9 ± 15.0	92.7 ± 16.6

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

The corticosterone concentration in AIT increased after 6 week and reduced after 12 week in comparison CT (Figure 7).

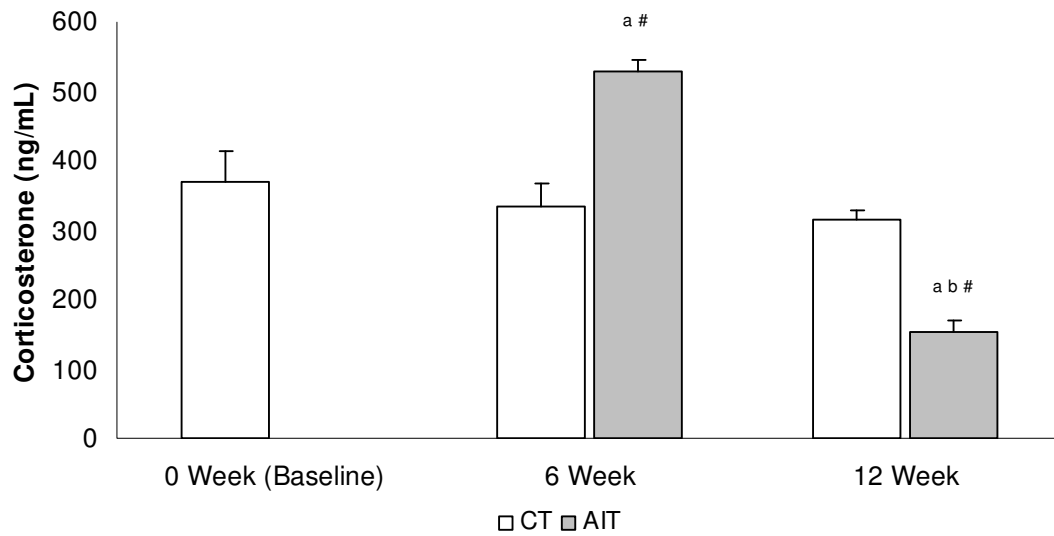


Figure 7. Corticosterone concentration in plasma analyzed after 0 week (Baseline), 6 week and 12 week.

^a Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 0 week.

^b Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 6 week.

[#] Significant differences ($P < 0.05$) in relation to CT in respective period.

The testosterone concentration unchanged during 12 week of AIT but showed a tendency of reduction after 6 and 12 week in comparison CT group (Figure 8).

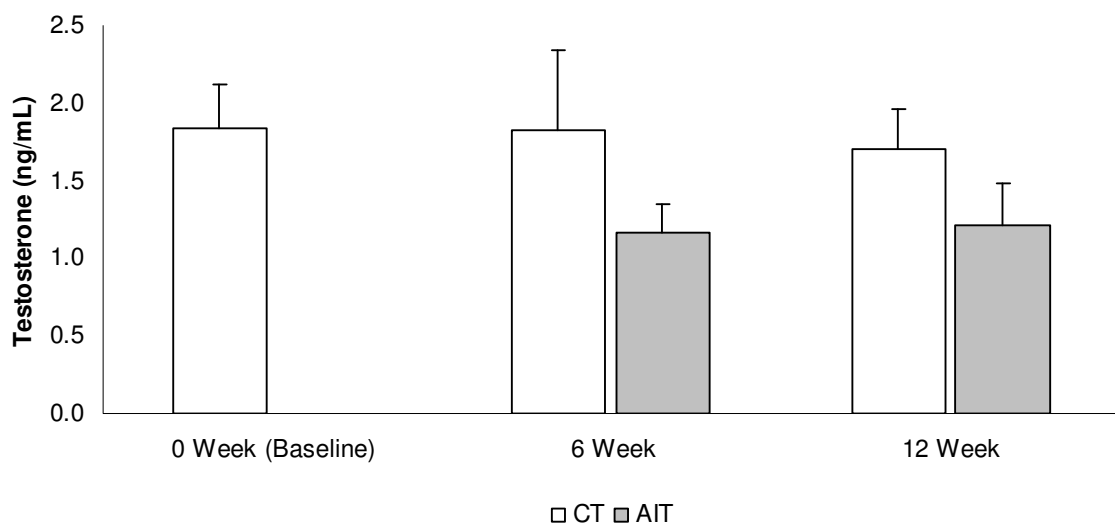


Figure 8. Testosterone concentration in plasma analyzed after 0 week (Baseline), 6 week and 12 week.

The variance percentage in relation to CT group reduced 15% in Creatinine and 8% for Urea but increased again after 12 week. The Uric Acid during 12 week did not exceed 5% of variance (Figure 9).

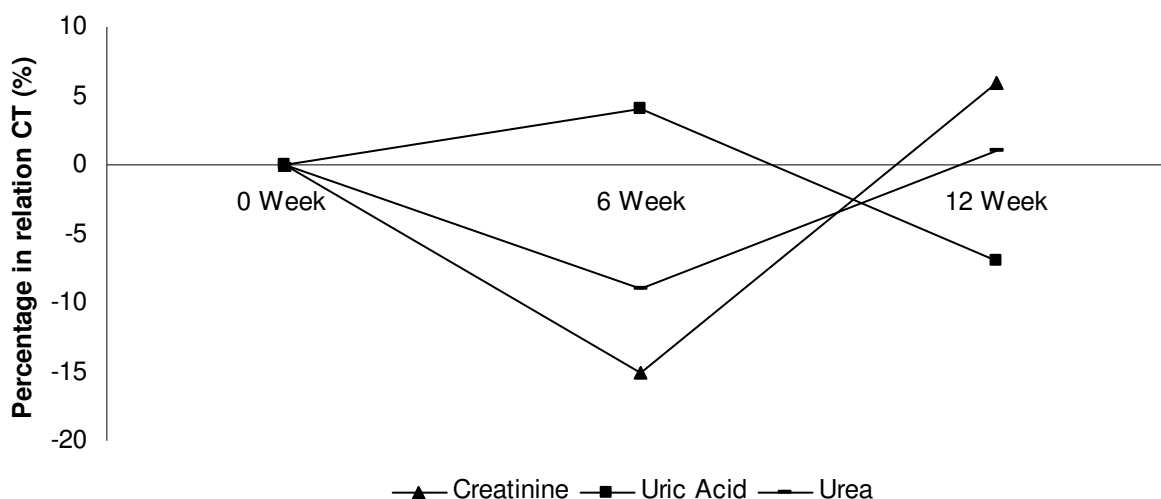


Figure 9. Variance percentage (%) of biochemical analyses (creatinine - mg/dL, Uric Acid - mg/dL and Urea- mg/dL) in comparison respective controls in each period of training.

Catalase and Sulphydryl Groups in AIT not changed after 6 and 12 week (Table 3).

The SOD activity after 12 week increased in relation 6 week for AIT group (Table 3).

Table 3. Sulphydryl Groups in plasma (μM), Catalase (U/mL) and superoxide dismutase (U/mL) in baseline (0week) after 6 week and 12 week in CT and AIT.

	0 Week	6 Week	12 Week
Catalase (U/mL)			
CT		5.4 ± 1.8	5.0 ± 1.9
AIT	4.1 ± 1.5	5.0 ± 1.2	8.1 ± 2.0
Sulphydryl Groups (μM)			
CT		1155 ± 84	1150 ± 81
AIT	1057 ± 61	819 ± 95	820 ± 58
SOD (U/mL)			
CT		28.0 ± 9.6	24.4 ± 10.6
AIT	23.2 ± 7.9	20.7 ± 8.0	31.1 ± 5.5^b

^b Significant differences ($P < 0.05$) in relation to 6 Week.

DISCUSSION

The purpose of this study was to characterize the aerobic-anaerobic performances, blood biomarkers (endocrine and enzymatic) and muscle and liver glycogen stores during 12 weeks of intermittent anaerobic training. Our initial hypothesis was that anaerobic and aerobic performance increased after training, but the results showed unchanged in LM and maintenance Tlim.

The strength training either develops anaerobic power or capacity depending the velocity, sets and repetitions (Minahann and Wood, 2008). Apparently, the AIT improved the anaerobic capacity increasing muscle glycogen but did not alter the anaerobic power measured by Tlim. Saltin (1987) verified that, the mechanisms limiting anaerobic power are divergent to the mechanisms that limit anaerobic capacity (Minahann and Wood, 2008). On the other hand, Minahan et al. (2007) verified in human beings that no significant relationship occurs between peak power measured during Wingate Anaerobic Test (anaerobic power) and the maximal accumulated oxygen deficit (anaerobic capacity) measured during exhaustive cycling. Therefore, the AIT increased glycogen stores in soleus and gastrocnemius but it did not induce to improvement in performance (Tlim).

Specially, the literature reports that aerobic training improves the Type I muscle fibers, mitochondria number and dimension, capillarization, oxidative enzymes and oxygen uptake (Knuttgen, 2007; Haran et al., 2008). So, the aerobic adaptation with AIT shows the importance of strength/power training for signaling a multitude of target cells. Also, the anaerobic training can efficiently stimulate the glycogen supercompensation, delay fatigue in Type I muscle fibers with consequent improvement of the aerobic performance (Haran et al., 2008).

Naturally, the aerobic capacity as well as Tlim reduce with the age (CT group). The AIT increased LM and attenuated Tlim. This phenomenon can be explained by

supercompensation mainly in soleus glycogen (Type I predominance) while the glycogen stores in white gastrocnemius increased after 12 weeks but did not increase Tlim. For the duration of the training, overload adjustments are necessary to re-emphasize the positive adaptation process (Issurin, 2008). Possibly, Tlim could increase with variations in overload progression, series and repetitions. In the present study, the absence of other loads probably impaired/inhibits great gains (Hedelin et al., 2000).

As a consequence of the stress training and incorrect training overloads, the muscle creatine kinase and lactate dehydrogenase are more released to the circulation increasing its plasma levels (Fry et al., 1992; Lee et al., 2008). In the present study, creatine kinase and lactate dehydrogenase showed a reduced muscle lesion during AIT. However, the increase in corticosterone (6 weeks) indicates protein catabolism and stress that were stabilized along the experimental period. On the other hand, testosterone concentration was unchanged in the CT group, showing inefficiency of this hormone as a training biomarker (Urhausen et al., 1998; Halson and Jeukendrup, 2004).

Urea and uric acid are formed during protein catabolism and may indicate indirectly the cellular/protein decomposition as well as the overtraining state (Lehmann et al., 1993; Halson and Jeukendrup, 2004). In the present study, uric acid increased at the same moment as corticosterone. However, urea and creatinine decreased after 6 weeks and returned to values in 12 weeks in relation to the CT group similarly to corticosterone at 6 weeks. Therefore, uric acid even with minimum variance (~5%), may be a supplementary analysis of the state of training. However, it is not clear the relationship of these metabolites with the training and volume/intensity variations (Lehmann et al., 1992).

In relation to antioxidant enzymes, the AIT did not increase the Superoxide Dismutase and Catalase activities in plasma. The overload in AIT did not increase oxygen consumption during exercise, decreasing mitochondrial activity. Also, even the transient periods of repeated

hypoxia and hyperoxia during jumps, the free radical levels neither causing oxidative damage (Sulphydryl Groups) nor antioxidant enzymes (Salo, Donovan & Davies, 1991).

In summary, Kramer et al. (2002) related that resistance training has been shown to be the most effective method for developing musculoskeletal strength and it is currently prescribed for improving health and fitness. For reaching these benefits, the load, sets and repetitions should be programmed according individuality characteristics and objectives. Therefore, in the present study, the jump training enabled to stimulate contraction posterior muscles (soleus and gastrocnemic) and can be an alternative method to simulate resistance training in humans.

In conclusion, these results show an amazing contribution of AIT to improve the aerobic performance that is interconnected with energetic supercompensation (muscle glycogen stores) and unaltered of biomarkers. Also, although the natural aerobic and anaerobic capacity decreased in CT group was observed, the physical training attenuated this natural fall, keeping the Tlim and increasing LM in relation to base line.

REFERENCES

1. Baldwin KM. Effects of chronic exercise on biochemical and functional properties of the heart. *Med Sci Sports Exerc.* 1985;17(5):522-8.
2. Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FA. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005 Apr;140(4):409-13.
3. de Souza CT, Nunes WM, Gobatto CA, de Mello MA. Insulin secretion in monosodium glutamate (MSG) obese rats submitted to aerobic exercise training. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 2003;35(1):43-53.

4. deAraujo GG, Papoti M, Manchado Fde B, de Mello MA, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;148(4):888-92.
5. Dubois B, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* 28, 1956:350–356.
6. Fry RW, Morton AR, Keast D. Periodisation and the prevention of overtraining. *Can J Sport Sci.* 1992;17(3):241-8
7. Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;130(1):21-7.
8. Halson SL, Jeukendrup AE. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med.* 2004;34(14):967-81.
9. Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MØ, Al-Share QY, Waldum HL, Gilligan LJ, Koch LG, Britton SL, Najjar SM, Wisløff U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res.* 2009;1;81(4):723-32.
10. Hedelin R, Kentta G, Wilklund U, Wiklund U, Bjerle P, Henriksson-Larsén K. Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(8):1480–84.
11. Issurin V. Block periodization versus traditional training theory: a review. *J Sports Med Phys Fitness.* 2008 ;48(1):65-75.
12. Knuttgen HG. Strength training and aerobic exercise: comparison and contrast. *J Strength Cond Res.* 2007;21(3):973-8.
13. Kramer et al. (2002). Progression Models in Resistance Training for Healthy Adults. 01 95-913 1/02/3402-0364/0 MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE.

14. Kuipers H. Training and overtraining: an introduction. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(7):1137-9.
15. Lee SH, Kim HJ, Mun JS, Oh HC, Lee HW, Choi CH, Kim JW, Do JH, Kim JG, Chang SK, Kim MK. A case of primary hepatic Burkitt's lymphoma. *Korean J Gastroenterol.* 2008;51(4):259-64
16. Lehmann M, Foster C, Keul J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(7):854-62.
17. Lehmann M, Gastmann U, Petersen KG, Bachl N, Seidel A, Khalaf AN, Fischer S, Keul J. Training-overtraining: performance, and hormone levels, after a defined increase in training volume versus intensity in experienced middle- and long-distance runners. *Br J Sports Med.* 1992;26(4):233-42.
18. Minahan C, Wood C. Strength training improves supramaximal cycling but not anaerobic capacity. *Eur J Appl Physiol.* 2008;102(6):659-66.
19. Minahan CL, Chia M, Inbar O (2007) Does power indicate capacity? 30-s Wingate Anaerobic Test vs. maximal accumulated O₂ deficit. *Int J Sports Med* 2007;28(10):836-43.
20. Pilis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uściłko H, Nazar K, Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1993;106(2):285-9.
21. Saltin B (1987) The physiological and biochemical basis of aerobic and anaerobic capacities in man: effect of training and range of adaptation. In: Mæhlum S, Nilsson A, Renström P (eds) *An update of sports medicine. Proceedings from the second Scandinavian Conference in Sports Medicine.* Oslo, Norway, pp 16–59
22. Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(5):620-7.

23. Urhausen A, Gabriel HH, Kindermann W. Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(3):407-14.
24. Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(11):1389-94.