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

PROTOCOLOS INVASIVOS E NÃO INVASIVOS PARA AVALIAÇÃO AERÓBIA E ANAERÓBIA DE RATOS WISTAR

FÚLVIA DE BARROS MANCHADO GOBATTO

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

RIO CLARO
Estado de São Paulo
Agosto – 2007

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

PROTOCOLOS INVASIVOS E NÃO INVASIVOS PARA AVALIAÇÃO AERÓBIA E ANAERÓBIA DE RATOS WISTAR

FÚLVIA DE BARROS MANCHADO GOBATTO

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello

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

**Esse trabalho foi financiado pela “FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO
ESTADO DE SÃO PAULO”**

FAPESP

Processo n° 04/07070-5

Dedicatória

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, Benito e Valkiria, meus irmãos, Diego e Thalles, meu marido Claudio e nosso futuro filho, Théo. Tudo é possível quando compartilhamos de um sentimento tão grandioso e divino. Amo vocês eternamente!!

AGRADECIMENTOS

- ♦ À Deus e Nossa Senhora, pela saúde, força e proteção durante todos esses anos;
- ♦ À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello, pela oportunidade, sabedoria, competência e profissionalismo. É extremamente gratificante poder contar com seu apoio profissional e convívio pessoal. Mais uma vez, muito obrigada por tudo!;
- ♦ Ao Prof. Dr. Eduardo Kokubun, meu orientador nas etapas anteriores, pelas oportunidades sempre oferecidas e amizade;
- ♦ Ao Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto, pelo profissionalismo e por todas as contribuições nos estudos desenvolvidos nessa etapa;
- ♦ Às docentes Profa. Dra. Eliete Luciano e Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum, que com suas grandiosas sugestões no Exame Geral de Qualificação, enriqueceram o presente trabalho. Agradeço também por aceitarem compor a Banca Examinadora da Defesa de Tese;
- ♦ Aos docentes Prof. Dr. Vilmar Baldissera, Dra. Angelina Zanesco, Prof. Dr. Eduardo Kokubun, Profa. Prof. Dr. Herbert Gustavo Simões, Profa. Dra. Rozangela Verlengia, Prof. Dr. Sérgio Perez e Prof. Dr. Nivaldo Parizotto, por aceitarem a sugestão de seus nomes para composição da Banca Examinadora;
- ♦ Aos docentes e funcionários do Departamento de Educação Física da UNESP Rio Claro, especialmente aos professores e amigos Sérgio Augusto Cunha, Angelina Zanesco, Eliete Luciano, Lilian Gobbi, Sebastião Gobbi, José Roberto Moreira de Azevedo, aos técnicos de Laboratório Clarice, Beto e China, pelos auxílios e amizade e aos funcionários da Biblioteca e das Seções de Graduação e Pós-Graduação, dentre eles à Sandra, Heloísa, Ruth, Marcos, Cibele e Sônia;
- ♦ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo fomento;
- ♦ Aos coordenadores, docentes, funcionários e alunos das Faculdades Integradas Einstein de Limeira, pela amizade e oportunidade de trabalho;
- ♦ Aos verdadeiros amigos com quem convivi nos anos de desenvolvimento do doutorado. Em especial, gostaria de agradecer ao Ricardo Contarteze, Gustavão, Carla, Clécia, Michel, Fabrício, Camila, Marcelo Papoti, Vanessa, Alessandro Zagatto, Adelino, Fernanda Toledo e Tati Thomaz. À todos vocês e outros não citados, muito obrigada pelas imensas contribuições pessoais e profissionais;

♦ Às minhas famílias Barros, Manchado e Gobatto. Em especial, agradeço aos meus avós Eulálio, Uyria e Ângela, dos quais sinto infinita saudades, avô Vicente pelo grande amor, aos meus sogro, sogra e sobrinha, Sérgio, Conceição e Carol, pelo amor, carinho e dedicação;

♦ Aos meus irmãos, Diego e Thalles, pelo amor, amizade, compreensão e companheirismo de sempre;

♦ Aos meus pais, Benito e Valkiria, por todo amor, exemplo de vida, apoio, sabedoria e dedicação. Não tenho palavras para agradecê-los por tudo o que sempre fizeram por mim e por nossa família. Vocês são pessoas maravilhosas, iluminadas por Deus!!

♦ Ao Claudio, pelo amor, afeto, companheirismo, paciência, exemplo e por todos os momentos lindos compartilhados nessa nossa vida, que, se Deus quiser, logo será enriquecida com mais um pequeno na família, o Théo. Obrigada por tudo!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	vi
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução Geral	3
1.1. Objetivos	6
2. Revisão da Literatura	8
2.1. Lactato sangüíneo	8
2.2. Limiar Anaeróbio	10
2.3. Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL)	12
2.4. Potência Crítica	15
2.4.1. Modelo de Potência Crítica proposto por Monod e Scherrer	15
2.4.2. Método Chassain	18
3. Materiais e Métodos	20
3.1. Local	20
3.2. Animais	20
3.3. Protocolos	20
3.3.a. Adaptação ao meio líquido	21
3.3.b. Adaptação à esteira rolante	22
3.3.1. Teste progressivo para a determinação do LAn	22

3.3.1.1. Natação	22
3.3.1.2. Esteira rolante.....	23
3.3.2. Protocolo de potência crítica proposto por Monod e Scherrer	23
3.3.2.1. Carga crítica na natação	23
3.3.2.2. Velocidade crítica na esteira rolante.....	25
3.3.3. Protocolo de potência crítica proposto por Chassain	26
3.3.3.1. Carga crítica na natação	26
3.3.3.2. Velocidade crítica na esteira rolante	27
4. Análise dos Resultados	27
4.1. Análises bioquímicas	27
4.1.1. Concentração de lactato sanguíneo	27
4.1.2. Glicogênio muscular	28
4.2. Análise estatística	28
5. Resultados	30
5.1. Estudo 1: Máxima fase estável de lactato em ratos corredores	34
Resumo	35
Abstract	36
Introdução	37
Materiais e Métodos	39

Resultados	41
Discussão	43
Conclusão	45
Referências Bibliográficas	45

5.2. Estudo 2: Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos50

Resumo	51
Abstract	52
Introdução	53
Materiais e Métodos	55
Resultados	59
Discussão	61
Conclusão	63
Referências Bibliográficas	64

5.3. Estudo 3: Protocolo não exaustivo para a determinação da capacidade aeróbia em natação de ratos 69

Resumo	70
Abstract	71

Introdução	72
Materiais e Métodos	75
Resultados	80
Discussão	82
Conclusão	85
Referências Bibliográficas	86

5.4. Estudo 4: Determinação não invasiva da carga crítica em ratos: efeitos da depleção de glicogênio muscular.....	91
Resumo	92
Abstract	93
Introdução	94
Materiais e Métodos	97
Resultados	103
Discussão	107
Conclusão	112
Referências Bibliográficas	112

5.5. Estudo 5: Determinação da velocidade crítica e capacidade anaeróbia de ratos	120
Resumo	121
Abstract	122
Introdução	123
Materiais e Métodos	126
Resultados	129
Discussão	132
Conclusão	135
Referências Bibliográficas	136

5.6. Estudo 6: Protocolo não exaustivo de duplos esforços para avaliação aeróbia de ratos corredores	142
Resumo	143
Abstract	144
Introdução	145
Materiais e Métodos	148
Resultados	152
Discussão	154
Conclusão	157

Referências Bibliográficas	157
----------------------------------	-----

5.7. Estudo 7: Efeito do ciclo claro-escuro na determinação da velocidade crítica e capacidade de corrida anaeróbia de ratos Wistar	162
---	-----

Resumo	163
--------------	-----

Abstract	164
----------------	-----

Introdução	165
------------------	-----

Materiais e Métodos	167
---------------------------	-----

Resultados	171
------------------	-----

Discussão	173
-----------------	-----

Conclusão	177
-----------------	-----

Referências Bibliográficas	177
----------------------------------	-----

5.8. Estudo 8: Limiar anaeróbio em corrida e natação para ratos: determinação por concentração fixa de lactato e bissegmentação da curva lactacidêmica	184
--	-----

Resumo	185
--------------	-----

Abstract	186
----------------	-----

Introdução	187
------------------	-----

Materiais e Métodos	189
---------------------------	-----

Resultados	195
------------------	-----

Discussão	196
Conclusão	200
Referências Bibliográficas	201
6. Discussão Geral.....	206
7. Conclusões Gerais.. ..	214
Referências Bibliográficas da Tese.....	217

LISTA DE ABREVIATURAS

ARC: *anaerobic running capacity*

bw: *body weight*

C: cargas

CCA: capacidade de corrida anaeróbia

Ccrit: carga crítica

CL: *critical load*

CI: ciclo normal

CV: *critical velocity*

CTA: capacidade de trabalho anaeróbio

E₁: esforço 1

E₂: esforço 2

FC: frequência cardíaca

LAC: lactato

LAn: limiar anaeróbio

MFEL: máxima fase estável de lactato

MLSS: *maximal lactate steady state*

pc: peso corporal

Pcrit: potência crítica

tlim: tempo limite ou tempo de exaustão

V: velocidade

Vcrit: velocidade crítica

VO₂: consumo de oxigênio

VO_{2máx} : consumo máximo de oxigênio

LISTA DE FIGURAS

ESTUDO 1

Figura 1.1. Concentrações de lactato sanguíneo durante teste de corrida contínua a 15m/min (n=10), 20 m/min (n=11), 25 m/min (n=10), 30 m/min (n=10) e 35 m/min (n=8). Os resultados estão expressos em média \pm epm. Em cada gráfico, as diferenças significantes (P<0,05) são: a) vs. valores de repouso; b) vs. repouso e 5 min de exercício; c) vs. repouso, 5 e 10 min de exercício; d) vs. repouso, 5, 10 e 15 min de exercício; e) vs. respouso, 5 e 15 min de exercício; f) vs. respouso, 20 e 25 min de exercício; g) vs. repouso,15, 20 e 25 minutos de exercício; h) vs. repouso, 5 e 25 min de exercício; i) vs. repouso, 5, 10 e 25 min de exercício; j) vs. repouso e todos os outros minutos de exercício avaliados.....p. 42

ESTUDO 2

Figura 2.1. Máxima fase estável de lactato sanguíneo obtida em exercício de natação para ratos (a) (n=20) e corrida em esteira rolante (n=20) (b). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. A lactacidemia durante o exercício foi superior à inicial em todos os casos. *diferença significativa entre a lactacidemia aos 5 minutos e os demais valores de lactato sanguíneo em todas as intensidades de exercício. # diferença significativa entre os valores de lactato sanguíneo na intensidade de 6% das demais intensidades, do décimo ao vigésimo quinto minuto de exercício. § diferença significativa entre a lactacidemia do décimo quinto ao vigésimo quinto minuto e os valores de lactato aos 5 minutos, nas velocidades equivalentes a 25 e 30m/min. x diferença significativa entre as curvas lactacidêmicas nas velocidades 25 e 30m/min comparadas às curvas de lactato obtidas à 15 e 20m/min, do décimo quinto ao vigésimo quinto minuto de exercício.....p. 60

ESTUDO 3

Figura 3.1. Protocolo experimental utilizado no presente estudo, baseado no Método Chassain (1986), inicialmente sugerido para a avaliação da capacidade aeróbia de humanos.....p. 78

Figura 3.2. Exemplo da determinação da carga crítica (Ccrit) de um único rato utilizando o procedimento não exaustivo de duplos esforços. Cada ponto expresso graficamente representa o delta lactato obtido em intensidade equivalente. A Ccrit estimada corresponde ao intercepto y da regressão linear obtida.....p. 79

Figura 3.3. Concentração de lactato sangüíneo durante testes de exercício contínuo com os ratos suportando cargas correspondentes a 90, 100 e 110% da Ccrit (n=15). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média.....p. 81

ESTUDO 4

Figura 4.1. Exemplo de regressão linear Carga x 1/tlim para um rato componente da amostra do estudo. O valor do coeficiente angular da reta de regressão equivale à CTA e o y-intercepto, à Ccrit desse animal.....p. 100

Figura 4.2. Máxima fase estável de lactato sangüíneo para os 10 ratos alimentados. Curvas de lactato em intensidades equivalentes a 80, 90 e 100% da Ccrit determinada por método não invasivo. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média.....p. 105

Figura 4.3. Máxima fase estável de lactato sangüíneo para os 10 ratos em jejum 12 horas. Curvas de lactato em intensidades equivalentes a 80, 90 e 100% da Ccrit determinada por método não invasivo. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média.....p.106

ESTUDO 5

Figura 5.1. Exemplo da regressão linear (velocidade vs. $1/t_{lim}^{-1}$) obtida para um rato. O valor da angulação da reta de regressão corresponde à capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e o Y-intercepto, à velocidade crítica (V_{crit}) desse animal.....p. 127

Figura 5.2. Tempo de exaustão (t_{lim}) obtido em quatro distintas intensidades. Os resultados estão expressos em média \pm epm. * Diferença significativa entre todos os valores ($P \leq 0,05$).....p. 130

Figura 5.3. Máxima fase estável de lactato de 13 ratos. Os resultados estão expressos em concentrações médias de lactato sanguíneo durante corrida contínua a 15, 20 e 25 m/min. Os resultados estão expressos em média \pm epm..... p. 131

ESTUDO 6

Figura 6.1. Protocolo experimental utilizado no presente estudo com ratos corredores, baseado no método Chassain (1986)..... p.150

Figura 6.2. Representação gráfica da interpolação linear obtida para a amostra analisada. A velocidade crítica (V_{crit}) obtida por procedimento de deltas lactato é equivalente ao y-intercepto da reta de regressão..... p.150

Figura 6.3. Máxima fase estável de lactato obtida em corrida ($n=13$). Resultados expressos em média \pm epm..... p. 153

ESTUDO 7

Figura 7.1. Exemplo da regressão linear (velocidade vs. $1/t_{lim}$) obtida para um rato. O valor da angulação da reta de regressão corresponde à capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e o Y-intercepto, à velocidade crítica (V_{crit}) desse animal..... p.170

Figura 7.2. Resultados percentuais da seleção de ratos corredores nos dois diferentes ciclos de luminosidade adotados no presente estudo..... p.171

Figura 7.3. Representação gráfica das regressões lineares médias (velocidade vs. $1/t_{lim}$) para os grupos ciclo normal (CN) e ciclo invertido (CI)..... p. 172

ESTUDO 8

Figura 8.1.a. Representação gráfica da análise de limiar anaeróbio por concentração fixa de lactato para um rato submetido ao teste em natação. **b.** análise matemática do limiar anaeróbio por bissegmentação das retas de regressão em rato corredor..... p.194

Figura 8.2. Percentuais de sucesso na determinação do limiar anaeróbio em natação e corrida em estira rolante. No eixo x estão expressos os métodos matemáticos utilizados para a análise, sendo eles concentração fixa de lactato em valores equivalentes à 4,0; 4,5; 5,0; 5,5mmol/L e bissegmentação das retas de regressão..... p.195

LISTA DE TABELAS

ESTUDO 3

Tabela 3.1. Valores individuais de delta lactato para cada intensidade (4, 6, 7 e 8% do peso corporal), carga crítica estimada pelo método dos duplos esforços (Ccrit) e valores de coeficiente de regressão linear (R).....p. 81

ESTUDO 4

Tabela 4.1. Resultados dos tempos de exaustão (tlim) mensurados em segundos, obtidos em cada intensidade (% do peso corporal), com os ratos em duas condições distintas: alimentados e após 12 horas de jejum.....p. 104

Tabela 4.2. Resultados da carga crítica (Ccrit, em % do PC), capacidade de trabalho anaeróbio (CTA, em % PC.s) e os valores da regressão linear (R^2) obtidos para cada rato, em duas diferentes condições: alimentados e após 12 horas de jejum.....p. 104

Tabela 4.3. Valores de glicogênio encontrados no gastrocnêmio, sóleo e fígado de ratos sacrificados em repouso (controle) e após exercício exaustivo (exercício), em ambos estados alimentares (alimentados e em jejum).....p. 106

ESTUDO 5

Tabela 5.1. Resultados individuais de velocidade crítica (Vcrit) e capacidade de corrida anaeróbia (CCA) dos ratos, estimadas por procedimento não invasivo e coeficiente de regressão linear (R^2).....p. 130

ESTUDO 6

Tabela 6.1. Concentrações de lactato sanguíneo durante testes de esforços em intensidades correspondente à 15, 20 e 25m/min (n=13). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média..... p. 153

ESTUDO 7

Tabela 7.1. Resultados de velocidade crítica (V_{crit}), capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e valores de R^2 para os ajustes lineares obtidos para os grupos ciclo normal (n=13) e ciclo invertido (CI) (n=11)..... p. 172

ESTUDO 8

Tabela 8.1. Resultados de limiar anaeróbio determinado pelas distintas formas de análise utilizadas no presente estudo, em dois ergômetros: natação e corrida em esteira rolante. Na tabela é possível observar a intensidade do exercício equivalente ao LAn, o número de ratos que apresentaram tal possibilidade de análise (n) e o valor de R^2 para o ajuste exponencial de crescimento, nos casos em que concentrações fixas de lactato foram utilizadas..... p. 196

RESUMO

Há grande importância em determinar a intensidade de exercício para o treinamento em ratos devido ao interesse de diversas áreas de pesquisas, envolvendo distintas condições fisiológicas desses animais. Portanto, é necessário otimizar protocolos de avaliação física para ratos exercitados, aumentando sua aplicabilidade. Desta forma, o objetivo geral da presente tese foi padronizar e testar diferentes modelos invasivos e não invasivos de avaliação aeróbia e anaeróbia em ratos Wistar, alimentados e após 12 horas de jejum, validando-os através da comparação com a máxima fase estável de lactato (MFEL) em dois exercícios distintos: natação e corrida em esteira rolante. Com essa finalidade, ratos jovens foram adaptados de maneira sistematizada à natação e à corrida em esteira rolante, para posterior determinação da zona de transição aeróbia-anaeróbia. Foram utilizados protocolos de limiar anaeróbio obtido por concentração fixa de lactato e inspeção visual do ponto de inflexão lactacidêmico, seguido por bissegmentação das retas de regressão; modelo de potência crítica não invasivo e exaustivo proposto por Monod e Scherrer (1965) e método invasivo e não exaustivo caracterizado por duplos esforços para a obtenção da potência crítica sugerida por Chassain (1986). As intensidades aeróbias foram comparadas à MFEL, considerada o padrão ouro desse sistema. Para a investigação da validade do parâmetro anaeróbio sugerido por Monod e Scherrer (1965), dosagens de reservas intramusculares de glicogênio foram efetuadas após exercício em intensidade equivalente à carga e velocidade crítica. Houve ainda a manipulação do ciclo de luminosidade claro-escuro para verificar os efeitos do ritmo circadiano na determinação de tais capacidades. Apesar das distintas características, todos os protocolos padronizados e utilizados foram capazes de estimar a zona de transição aeróbia-anaeróbia.

ABSTRACT

For obvious reasons, a large number of studies involving exercise is conducted in laboratory animals, mainly rats. Therefore, it is necessary to develop methods for physical evaluation of exercised rats. The aim of present study was to describe and to test different aerobic and anaerobic evaluation models, invasive or non-invasive, for rats. The protocols were validated using the maximal lactate steady state (MLSS). Wistar rats were evaluated in two different exercise types: swimming and treadmill running. The Wistar rats were adapted to swimming exercise and treadmill running. After this, we determined the aerobic/anaerobic transition zone. We used three protocols: incremental test for determine the lactate threshold using fixed blood lactate concentration and individual inflection point of blood lactate curve; non-invasive critical power model purposed by Monod and Scherrer (1965) and the double bouts exercise test for non-exhaustive aerobic capacity purposed by Chassain (1986). The aerobic intensities were compared with the MLSS, considered an important indicator of endurance exercise capacity. To investigate the validity of anaerobic parameter suggest by Monod and Scherrer (1965), muscle glycogen stores were accomplished after exercise at intensity equivalent to critical load and critical velocity. The effect of the light-dark cycle on the aerobic and anaerobic capacity was also investigated.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O fornecimento de adenosina trifosfato para a manutenção do exercício pode ser proveniente dos metabolismos aeróbio ou anaeróbio. Em exercício moderado, as respostas fisiológicas apresentam rápida estabilização e a presença de oxigênio supre de forma satisfatória a demanda energética imposta. Em intensidades demasiadamente superiores, a via metabólica predominante é anaeróbia, o que resulta na redução abrupta do pH muscular devido a incapacidade de ajustes em consequência do aumento da produção de lactato, o que dificulta a realização do exercício por tempo prolongado, já que isso inibe a atividade enzimática e reduz a afinidade de Ca^{++} à troponina.

Existe uma zona de transição a partir da qual há mudança de predominância do metabolismo aeróbio para o anaeróbio, sendo essa zona de exercício extremamente importante para o condicionamento físico, treinamento e rendimento desportivo. Por esse motivo, diversas investigações acerca dessa intensidade vêm sendo realizadas nas últimas décadas, culminando em distintos protocolos fisiológicos de avaliação. Dentre os mais utilizados podemos citar o limiar ventilatório observado por Wasserman e McIlroy, em 1964; a utilização de concentração de lactato sanguíneo para identificar o limiar anaeróbio (LAn), proposto por Kinderman et al. (1979); o limiar anaeróbio obtido pela concentração fixa de 4,0mmol/L (OBLA) inicialmente

sugerido por Sjödín e Jacobs (1981); o protocolo de limiar anaeróbio individual apresentado por Tegtbur et al. (1993); execução de duplos esforços para a identificação da potência crítica verificando a variação de FC e lactacidemia entre esses esforços (Chassain, 1986) e o modelo de potência crítica não invasivo e exaustivo proposto por Monod e Scherrer, em 1965, dentre outros.

Grande parte desses protocolos de avaliação utiliza a resposta das concentrações de lactato sanguíneo devido à fidedignidade desse parâmetro bioquímico na mensuração da intensidade de transição entre os metabolismos, bem como excelente resposta ao treinamento físico, permitindo, além da caracterização do esforço, um acompanhamento da eficiência do treinamento crônico. Por outro lado, há evidências de que é possível determiná-la simplesmente através da relação entre intensidade de esforço e sua duração até a exaustão (Monod e Scherrer, 1965).

Muitos estudos vêm testando a validade de tais protocolos em seres humanos, comparando os valores encontrados à máxima fase estável de lactato, intensidade na qual a capacidade de remoção desse metabólito permite compensar sua produção e que efetivamente é o último momento em que o metabolismo aeróbio ainda é predominante.

A fisiologia do exercício tem usado, ao longo dos anos, recursos de modelos animais, especialmente para a prática de manipulações mais invasivas, efetuando análises aos níveis celular e molecular. A utilização de mamíferos em pesquisas laboratoriais procura simular condições de estresse físico observado em seres humanos, visando o acompanhamento mais apropriado das alterações sistêmicas decorrentes do exercício. Dentre os mais usados “ergômetros” para animais estão a esteira rolante e a natação, e os mamíferos mais avaliados são, sem dúvida, os ratos, por serem pequenos, de fácil manipulação e de boa resposta ao exercício.

Um número significativo de pesquisas envolvendo exercício tem sido realizado com ratos, sendo o lactato sanguíneo adotado em muitas delas para a determinação da intensidade do esforço. Entretanto, tal procedimento é dificultado pela carência de informações referentes à cinética do lactato em ratos, especialmente em exercícios de natação. Nosso grupo de pesquisa vem, há aproximadamente uma década, testando esses modelos de avaliação e comportamento do lactato em exercício. Inicialmente, foi padronizado um teste com cargas progressivas na tentativa de verificar as respostas funcionais dos ratos na mobilização de substratos energéticos em situação de estresse físico agudo, progressivamente mais intenso (Gobatto et al., 1991). Após muita investigação, foi determinado o valor da máxima fase estável de lactato obtida com ratos Wistar por protocolos de exercício com cargas contínuas à 5,5mmol/L e tal concentração comprovada quando os animais foram submetidos ao treinamento (Gobatto et al., 2001). Posteriormente, Voltarelli et al. (2002) desenvolveram um estudo para a determinação do limiar anaeróbio individual a partir do protocolo de Tegtbur et al. (1993), encontrando padrões de lactacidemia semelhantes à de humanos. Também foi testada por Marangon et al. (2002), em estudo pioneiro, a determinação da intensidade de carga crítica em ratos, em modelo não invasivo.

Há grande importância em determinar a intensidade de exercício para o treinamento em ratos devido à ampla utilização dos animais exercitados por diversas áreas de investigação envolvendo condições fisiológicas distintas (Luciano e Mello, 1998; Brum et al., 2000; Azevedo et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Braga et al., 2006). Portanto, otimizar protocolos de avaliação, facilitando a aplicabilidade e reduzindo o desenvolvimento de fatores estressantes, é fundamental para a continuidade de investigações acerca dos efeitos da atividade física na prevenção e controle de patologias.

Os resultados obtidos em nossos estudos anteriores são extremamente satisfatórios por iniciarem e direcionarem a utilização de protocolos de avaliação aeróbia aplicada à ratos Wistar. Entretanto, ainda há necessidade de ampliar as investigações acerca desses modelos, tanto invasivos utilizando lactacidemia, quanto não invasivos, em exercício de natação e corrida em esteira rolante.

1.1. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- ♦ Padronizar e testar diferentes modelos invasivos e não invasivos de avaliação aeróbia e anaeróbia para ratos Wistar, validando-os através da comparação com a máxima fase estável de lactato, em dois exercícios distintos: natação e corrida em esteira rolante.

Objetivos específicos:

- ♦ Padronizar o protocolo de máxima fase estável de lactato para determinação da intensidade de transição metabólica de ratos corredores;
- ♦ Testar o protocolo de máxima fase estável de lactato já adaptado à natação de ratos;
- ♦ Comparar os valores de carga e velocidade crítica obtidas por protocolo não exaustivo de potência crítica sugerido por Chassain. (1986) e parâmetro aeróbio do modelo de potência crítica proposto por Monod e Scherrer (1965) com a máxima fase estável de lactato sanguíneo, durante exercício realizado nessas intensidades;

- ◆ Investigar a validade do parâmetro anaeróbio proposto pelo modelo de potência crítica, utilizando como referência os estoques de glicogênio muscular após exercícios realizados na carga crítica, acima e abaixo dessa intensidade;

- ◆ Verificar se os valores de carga crítica obtidos pelo modelo proposto por Monod e Scherrer (1965) sofrem influência da redução dos estoques de glicogênio muscular induzida por 12 horas de jejum.

- ◆ Determinar o limiar anaeróbio em natação e corrida a partir de testes progressivos, analisando-os por dois métodos matemáticos: concentração fixa de lactato e inspeção visual do ponto de inflexão lactacidêmico, precedida por bissegmentação das retas de regressão;

- ◆ Investigar o efeito do ciclo claro-escuro na determinação dos parâmetros do modelo de potência crítica em exercício de corrida em esteira rolante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A proposta da revisão de literatura a seguir será caracterizar a importância do lactato sanguíneo como um indicador de metabolismo utilizado na produção de energia bem como exprimir a relevância dos modelos de avaliação que serão utilizados em nossa pesquisa.

2.1. Lactato sanguíneo

Os músculos esqueléticos produzem lactato durante o exercício, especialmente na transição do repouso ao exercício intenso, o qual é liberado na corrente sanguínea ou acumulado nas fibras musculares. Esse metabólito é produzido por duas razões. A primeira delas refere-se à aceleração da glicólise na atividade muscular para a produção de ATP e, a segunda explicita a máxima capacidade glicolítica excedendo a máxima capacidade oxidativa para o fornecimento dessa energia (Juel, 2001).

O aumento da concentração de lactato no tecido muscular eleva a osmolaridade, o que promove o acúmulo de água no interior das células aumentando a pressão intramuscular, promovendo a diluição iônica e reduzindo a circulação sanguínea local (Roberts e Smith, 1989). Sabe-se que os músculos esqueléticos desempenham também papel importante na remoção do lactato circulante, uma vez que a massa muscular é a principal consumidora desse metabólito, que pode ser utilizado como substrato nos processos oxidativos ou gliconeogênicos, como

sugerido por Pilegaard et al. (1993). Os autores observaram que os tipos de fibras musculares estão estreitamente relacionados com esse fenômeno. Segundo Pilegaard et al. (1993), um mesmo músculo em atividade pode simultaneamente apresentar produção e consumo do lactato, com suas fibras que apresentam capacidade oxidativa limitada (fibras de contração rápida - brancas) produzindo-o, enquanto é consumido pelas fibras vermelhas (contração lenta), com elevada capacidade oxidativa.

Durante o exercício físico foi observado que o lactato intramuscular, assim como sua liberação, estão aumentados. Porém, esta produção/remoção é variável de acordo com o tipo e intensidade do esforço. Em seres humanos, no trabalho físico intenso, verificou-se um gradiente de concentração do músculo para o sangue. Em atividade física leve e prolongada, observou-se que a concentração do lactato no sangue e no músculo aumentou no início do exercício e diminuiu posteriormente, aproximando-se aos valores de repouso se o trabalho físico for continuado por uma ou duas horas (Roth, 1991). Durante o exercício progressivo, em atletas treinados ou indivíduos bem condicionados, o maior acúmulo do lactato sanguíneo foi associado a uma maior capacidade de remoção do músculo durante o exercício e na recuperação (Oyono-Enguelle et al., 1990). Em exercício prolongado com intensidade de 60% do $VO_{2máx}$, indivíduos do gênero masculino apresentaram redução do lactato sanguíneo para uma mesma carga após programa de treinamento de 12 semanas (Coggan et al., 1993).

Estudos com animais também reportam o comportamento do lactato frente ao esforço. Pilegaard et al. (1993) submeteram ratos a três programas de treinamento físico diferentes, durante sete semanas. Os protocolos de treinamento foram considerados moderado, intenso e leve, sendo os dois primeiros realizados de maneira intermitente em esteira rolante (com velocidades e intervalos de esforço/pausa diferentes) e o último, em natação contínua sem sobrecarga. A partir de estudos com vesículas de sarcolemas gigantes, os autores relataram que

os animais envolvidos no treinamento físico intenso e moderado apresentaram maior atividade de transporte de lactato mediado por carreador. Estes resultados não foram observados para o treinamento leve. Roth (1991) já havia observado o efeito aumentado do transporte de lactato em estudos anteriores, mas seus dados não apresentaram diferenças entre treinamentos de velocidade e resistência muscular.

Devido ao grande número de estudos, é possível afirmar que o lactato sanguíneo é um bom indicador da intensidade do exercício e que sua redução no sangue em mesma intensidade de trabalho após um período de treinamento físico aponta um efeito positivo da atividade crônica, especialmente sobre o metabolismo oxidativo (Schabort, et al., 2000; Pyne et al., 2001; Harnish et al., 2001). As observações acerca das concentrações de lactato sanguíneo também permitiram a caracterização da intensidade de esforço, possibilitando, especialmente em humanos, o aparecimento de protocolos de avaliação padronizados, os quais determinam o chamado “limiar anaeróbio”.

2.2. Limiar Anaeróbio

O termo limiar anaeróbio foi inicialmente sugerido por Wasserman e McIlroy (1964). Posteriormente, Kinderman et al. (1979), estudando a transição energética entre o sistema aeróbio anaeróbio, observaram a mudança da predominância entre os metabolismos quando a concentração sanguínea de lactato encontra-se entre 2,0 e 4,0mmol/L, relatando ainda a existência de um limiar aeróbio em concentração próxima a 2,0mmol/L e limiar anaeróbio próxima ao valor 4,0mmol/L de lactato.

Em 1981, Sjödín e Jacobs encontraram o valor 4,0mmol/L como concentração de lactato para o exercício aeróbio, denominando a respectiva intensidade de “onset of blood lactate

accumulation” (OBLA). Posteriormente, Heck et al. (1985), observando o comportamento do lactato em cargas constantes também verificaram que a máxima fase estável de lactato sanguíneo em humanos ocorreu em concentração 4,0mmol/L, com um desvio de $\pm 1,5$ mmol/L, confirmando a hipótese de Kinderman et al. (1979) e Sjödin e Jacobs (1981). Diversos estudos com humanos reportam a possibilidade de utilização da intensidade de exercício referente ao limiar anaeróbio determinado por concentração fixa como zona de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio, indicando alta correlação desse valor identificado por lactacidemia aos limiares obtidos por espirometria (Hollmann, 1985; Jones e Doust, 1998, Gaskill et al., 2001).

Em animais de laboratório, a utilização da lactacidemia ainda é comprometida pela carência de informações referentes à cinética de lactato em ratos, especialmente em exercícios de natação. A dificuldade em determinar a intensidade do LAn nesse exercício encontra-se no incremento de cargas, necessariamente pesos atados ao dorso do animal. Na esteira rolante para ratos, a intensidade do esforço é aumentada com o incremento de velocidade ou inclinação, possibilitando a determinação do limiar anaeróbio a partir de protocolo progressivo semelhante ao utilizado com humanos (Pilis et al., 1993; Langfort et al., 1996).

Na tentativa de encontrar a intensidade de limiar anaeróbio em ratos utilizando a natação, Gobatto et al. (1991) procuraram padronizar um protocolo específico de incremento de cargas, que consistiu de quatro intensidades de cinco minutos com valores de 0, 5, 8 e 13% do peso corporal total do animal. Foram realizadas coletas de amostras sanguíneas ao final de cada estágio para posterior determinação da lactacidemia. Nesse experimento, os animais foram submetidos ao protocolo progressivo antes e após um treinamento aeróbio de seis semanas de uma hora diária, nadando com 5% do peso corporal total. Os resultados revelaram aumento

brusco nas concentrações de lactato sanguíneo pré-treinamento e redução desses valores em teste pós-treinamento, porém não houve a possibilidade de determinação da cinética representativa da lactacidemia.

Houve então a tentativa de determinação da máxima fase estável, como o sugerido por Heck et al. (1985) em seres humanos. Para isso, os animais adaptados ao meio líquido foram submetidos a 20 minutos de natação em intensidades aleatórias de 5, 6, 7, 8, 9 e 10% do peso corporal total. Em todas as intensidades contínuas foram coletadas amostras sanguíneas a cada 5 minutos de exercício. Os autores observaram a máxima fase estável de lactato na intensidade de 6% do peso corporal, com o valor da concentração de lactato sanguíneo em 5,5mmol/L. Esse valor é diferente e superior ao reportado para humanos em distintos exercícios e para ratos realizando esforço em esteira rolante (aproximadamente 4mmol/L). Segundo Beneke et al. (1995), a concentração de lactato sanguíneo na intensidade de máxima fase estável é dependente do ergômetro utilizado, ao menos para humanos. Em revisão recente sobre a máxima fase estável de lactato, Billat et al. (2003) apontam como representativos para estudos com animais os achados de Gobatto et al. (2001).

2.3. Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL)

Como já mencionado anteriormente, a máxima fase estável representa, efetivamente, a mais alta intensidade na qual ainda é possível verificar a estabilização do lactato sanguíneo em exercícios de longa duração, proveniente do equilíbrio entre produção e remoção do lactato em esforços de endurance (Mader e Heck, 1986; Harnish et al., 2001).

O protocolo para a determinação da máxima fase estável de lactato consiste na aplicação de diversas intensidades constantes por longa duração, realizadas em dias distintos. Em cada uma das cargas são coletadas amostras sanguíneas em momentos pré-determinados, usualmente a

cada cinco minutos de esforço, para a posterior observação da curva de lactacidemia. A vantagem da aplicação de testes que encontram a MFEL é a identificação individual e mais fidedigna da transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio, sendo esse procedimento considerado o “padrão ouro” na validação de outros protocolos aeróbios para a avaliação humana (Billat et al., 2003; Beneke, 2003).

Em um de seus estudos, Beneke (2003) testou a variação da MFEL com a duração das séries de esforços contínuos, aplicando cinco testes em cicloergômetro, em dias distintos e com duração de 30 minutos. A MFEL foi determinada utilizando critérios de variação inferior a 1mmol/L do 10º ao 30º minuto de exercício, alteração menor que 0,5 mmol/L do 10º ao 20º minuto e alteração inferior a 0,2mmol/L do 10º ao 20º minuto. Os resultados de esse estudo demonstraram existir distinção entre os critérios de determinação da MFEL, sugerindo melhores resultados com o critério de variação lactacidêmica igual ou inferior a 1mmol/L do 10º ao 30º minuto de exercício.

A comparação entre as intensidades de LAn obtido por concentração fixa de lactacidemia em 4mmol/L, limiar anaeróbio individual e MFEL de humanos foi alvo de estudos realizados por Beneke et al. (1995). Os autores verificaram que em ergômetro de remo, a intensidade de limiar anaeróbio individual ($287,1 \pm 25,1W$) e LAn 4mmol/L ($287,0 \pm 20,5W$) foram superiores à MFEL ($255,1 \pm 17,5W$). No entanto, obtiveram correlações elevadas entre esses parâmetros ($r = 0,81$ e $0,82$, respectivamente). Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira et al. (2002), que aplicaram protocolos para a determinação do LAn nas distâncias de 200 e 400 metros na natação, em concentração fixa de lactato de 3,5mmol/L. Da mesma forma que Beneke et al. (1995), os autores sugerem que o protocolo utilizado para a determinação do LAn superestimou a MFEL, nesse caso, em 3,6%.

Os protocolos do lactato mínimo e modelo de potência crítica também vêm sendo testados com a utilização da MFEL. Pringle e Jones (2002) determinaram a potência equivalente à máxima fase estável de lactato em cicloergômetro e compararam essa intensidade à Pcrit e limiar de fadiga, hipotetizando encontrar resultados equivalentes para esses parâmetros. Os autores verificaram que a Pcrit encontrada pelo modelo de Monod e Scherrer (1965) superestimou a potência de estabilização máxima do lactato sanguíneo em aproximadamente 10%.

Em ratos, raros são os estudos que utilizam esse método para testar as intensidades predominantemente aeróbias. Gobatto et al. (2001) observaram MFEL em intensidade correspondente á 6% do peso corporal de animais submetidos a exercício de natação, ocorrendo em concentração de estabilização igual a 5,5mmol/L. Posteriormente, não encontraram diferença entre a carga crítica (Ccrit) determinada por método não invasivo e a MFEL, ambas ocorrendo a 7,1% do peso corporal dos animais (Marangon et al., 2002). Quando comparados os estudos de Gobatto et al. (2001) e Marangon et al. (2002), encontramos valores distintos de MFEL.

2.4. Potência Crítica

2.4.1. Modelo de Potência Crítica proposto por Monod e Scherrer

Procedimentos invasivos para a análise das variáveis fisiológicas permitem a obtenção de resultados precisos que fornecem subsídios para identificação do metabolismo predominante durante o esforço. Por outro lado, há evidências de que é possível determinar a transição de utilização do metabolismo aeróbio para anaeróbio simplesmente através da relação entre intensidade de esforço e sua duração até a exaustão, que se manifesta através de uma função hiperbólica (Monod e Scherrer, 1965). O ajuste da função a dados experimentais revelou a existência de uma assíntota, denominada potência crítica (Pcrit), que corresponde, teoricamente,

à mais alta intensidade em que o exercício pode ser realizado sem exaustão, portanto representando uma capacidade aeróbia. Acima dessa potência, há a utilização de um estoque limitado de energia anaeróbia para atender as necessidades adicionais do esforço. Segundo o modelo, esgotamento desse estoque, denominado capacidade de trabalho anaeróbio (CTA), conduz o executante à exaustão (Bishop et al., 1998). Dessa forma, o modelo de potência crítica apresenta a vantagem de determinar, por método matemático, tanto a capacidade aeróbia (P_{crit}), quanto o estoque de energia anaeróbia (CTA) do avaliado. Segundo Hill et al. (2002) e Gaesser e Poole (1996), a potência crítica também caracteriza a intensidade de transição entre os metabolismos.

Walsh (2000) destacou a relevância da teoria da potência crítica para a explicação da ocorrência de exaustão durante um esforço. Segundo o autor, o principal determinante do esgotamento de energia para a realização do exercício está relacionado a utilização do oxigênio. Quando o organismo possui maior habilidade para utilização de O_2 , conseqüentemente permanece se exercitando em determinada intensidade por um maior tempo, sem a utilização predominante dos estoques anaeróbios de energia. Walsh (2000) também propôs em seu estudo que o conceito de P_{crit} pode ser estendido para todos os sistemas que compõe o organismo, sugerindo que cada um desses sistemas apresenta a sua própria intensidade de esforço, a P_{crit} , que pode ser mantida teoricamente sem exaustão. O autor ainda comenta que os sistemas cardíacos e respiratórios apresentam uma P_{crit} maior que os outros sistemas, devido à sua importância em proteger e manter a homeostasia corporal durante um esforço, o que propicia o bom funcionamento aeróbio da totalidade do organismo. A análise realizada pelo autor sobre a importância do modelo ainda necessita de maiores investigações, haja vista que a proposta inicial sugerida por Monod e Scherrer apenas creditava ao ajuste matemático a possibilidade de

determinação da Pcrit e CTA, sem sugerir quais sistemas estariam mais relacionados à intensidade da Pcrit e quais as reservas anaeróbias são entendidas como CTA.

A metodologia empregada na determinação da Pcrit e CTA é simples e não invasiva, sendo necessários apenas um cronômetro e um ergômetro. O protocolo consiste na realização de esforços máximos executados em um ergômetro, no qual verifica-se o tempo de exercício limite (tlim) em cada intensidade. Controvérsias quanto ao número de esforços ideal são encontradas na literatura. Segundo Hill (1993) e Bishop et al. (1998) três cargas exaustivas distintas são suficientes para tal determinação, desde que o tempo limite de exercício encontre-se entre 1 e 10 minutos.

Em humanos, o parâmetro aeróbio do modelo de potência crítica parece ser válido devido à altas correlações observadas entre a Pcrit e intensidades determinadas por procedimentos invasivos, tais como o limiar anaeróbio obtido por concentração fixa de lactato sanguíneo (Kokubun et al., 1996; Manchado e Kokubun, 2004), limiar anaeróbio individual (McLellan e Cheung, 1992; Wakayoshi et al., 1992; Jenkins e Quigley, 1998). Porém, a Pcrit parece superestimar a máxima fase estável das variáveis fisiológicas, inclusive do lactato sanguíneo (Pringle e Jones, 2002).

Diferente da Pcrit, que já é bem consolidada como parâmetro aeróbio, o significado fisiológico da capacidade de trabalho anaeróbio (CTA) ainda está sendo alvo de inúmeras pesquisas. Isso devido a dificuldade em estimar o acúmulo total ou degradação dos metabólitos associados com a ressíntese de adenosina trifosfato (ATP) para a musculatura ativa, o que pode ser melhor entendido com estudos em animais de laboratório. Mesmo com essa dificuldade, a CTA parece ser moderadamente correlacionada com indicadores anaeróbios tais como o déficit de oxigênio proposto por MADBO (Hill e Smith, 1994).

Em 2002, Marangon et al. aplicaram os conceitos teóricos não invasivos da potência crítica em ratos Wistar, objetivando validar esse protocolo em natação. Os ratos foram submetidos a quatro testes de cargas (C) contínuas de 9, 11, 13 e 15% do peso corporal, distribuídas aleatoriamente e em dias consecutivos, nadando em cada uma delas até a exaustão. Com isso, foram verificados os tempos limites em cada intensidade e aplicados à equação hiperbólica, ajustada linearmente pela função $C = C_{crit} + CTA \cdot 1/t_{lim}$, onde a carga crítica corresponde ao intercepto y e a CTA, ao coeficiente angular da reta de regressão. Para a verificação da máxima fase estável de lactato em 20 minutos, os animais nadaram em quatro intensidades contínuas baseadas nos resultados anteriormente obtidos (90% da C_{crit} , 100% da C_{crit} , t_{lim20} e t_{lim15}). Os autores observaram máxima fase estável de lactato em intensidade de carga crítica.

De acordo com o modelo de potência crítica, as intensidades de 90% e 100% da C_{crit} não deveriam promover depleção do glicogênio muscular, entretanto, para o músculo gastrocnêmio, foram observadas reduções significativas dos estoques intramusculares desse substrato. Quando os animais foram submetidos a exercício nas intensidades de exaustão previstas para 20 (t_{lim20}) e 15 (t_{lim15}) minutos houve confirmação dessa predição, porém com estoques repletos de glicogênio muscular, o que coloca em questão a aplicabilidade da CTA. Portanto, os autores sugeriram mais investigações especialmente acerca desse parâmetro.

Recentemente, Gobatto et al. (2005) tentaram investigar a influência da depleção prévia de glicogênio muscular na determinação da carga crítica e CTA em exercício de natação de ratos. Os resultados obtidos revelaram que o modelo matemático proposto para a análise desses parâmetros é sensível à condição fisiológica do animal, haja vista que a C_{crit} não sofreu alterações após jejum fisiológico de 12 horas, porém a CTA foi reduzida com a depleção dos

estoques intramusculares de energia. Ainda assim, maiores investigações acerca da CTA são sugeridas.

Outros pesquisadores estão utilizando o modelo de potência crítica para a avaliação de animais. Billat et al. (2005), adaptou o protocolo à esteira rolante para avaliação da velocidade crítica de camundongos de distintas linhagens, porém nada relatou sobre o parâmetro anaeróbio CTA.

2.4.2. Método Chassain

Também sugerindo a existência de uma potência crítica, Chassain (1986) desenvolveram uma metodologia baseada na frequência cardíaca, consumo de oxigênio e lactacidemia. O pressuposto inicial seguido pelo autor foi a existência de uma intensidade alta na qual há estabilização das variáveis fisiológicas, mesmo quando executada em distintos esforços segregados por uma recuperação passiva. Portanto, o método conhecido como Chassain consiste em submeter o indivíduo à esforços “duplos”, ou seja, duas sessões de exercício de mesma intensidade, com duração de três minutos cada uma, intercaladas por um intervalo de recuperação de 1,5 minutos (Chassain, 1986).

Durante a realização de cada série é registrada a FC, sendo tomado como referencial o valor mais alto, o que permite analisar a variação de FC entre o primeiro (E1) e o segundo (E2) exercício utilizando a equação: $\Delta FC = FC_{E2} - FC_{E1}$. Com os resultados obtidos, plota-se um gráfico e por extrapolação ou interpolação linear é verificado o valor da intensidade em que o $\Delta FC = 0$, no qual, ao menos teoricamente, ocorre a máxima fase estável de FC. Esse ponto é entendido como a potência crítica.

Além da FC, podem ser utilizados os comportamentos de lactato e VO_2 para a mesma análise, o que vem sendo testado com humanos. Cavalheri et al. (1997) aplicaram a metodologia

sugerida por Chassain (1986), tanto com a mensuração de FC quanto por análise de lactacidemia, em atletas de fundo e meio fundo do atletismo. Houve ainda a determinação do limiar anaeróbio dos indivíduos utilizando a concentração fixa de lactato sanguíneo de 3,5 mmol/L. A partir dessas determinações foi observada alta correlação entre o LAN e as Pcrits obtidas pelo método Chassain.

O método Chassain de determinação de Pcrit só avalia o parâmetro aeróbio, enquanto o modelo de potência crítica por cargas exaustivas possibilita a identificação dos parâmetros aeróbio (Pcrit) e anaeróbio (CTA), com anteriormente descrito. A vantagem apresentada por Chassain (1986) é a ausência de procedimento exaustivo na obtenção da Pcrit, bem como a praticidade em sua determinação. Por outro lado, quando realizado com o auxílio da lactacidemia, a procedência do protocolo é invasiva.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biodinâmica da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro.

3.2. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, inicialmente com 70 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista de Botucatu-SP (UNESP). Os animais foram mantidos no Laboratório de Biodinâmica da UNESP-Rio Claro, alojados em gaiolas coletivas de polietileno (5 animais por gaiola), em uma sala iluminada das 6:00 às 18:00hs, à temperatura de aproximadamente 25°C. Durante todo o período, os animais receberam água e ração comercial para roedores (Labina, Purina) *ad libitum*. Apenas nos experimentos 4 e 7, houve alteração na condição alimentar e ciclo de luminosidade, respectivamente.

3.3. Protocolos

Para a realização dessa tese, os animais foram submetidos à diversos protocolos de avaliação aeróbia e anaeróbia, realizados em dois tipos de exercício: natação e corrida em esteira rolante. Dessa forma, houve a necessidade de adaptação dos ratos aos ergômetros utilizados.

3.3.a. Adaptação ao meio líquido

Anteriormente à realização de todos os protocolos realizados na água, os ratos foram adaptados ao meio líquido de forma padronizada. A adaptação ocorreu no período total de 15 dias ininterruptos, com a temperatura da água mantida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$. Inicialmente os ratos foram inseridos em água rasa por três dias durante quinze minutos. Posteriormente, o nível da água foi aumentado, bem como o tempo de duração do esforço e a carga a ser sustentada pelo animal. Assim, no quarto dia, os ratos nadaram em água profunda por dois minutos, com acréscimo de dois minutos a cada dia até o décimo dia de adaptação. No décimo primeiro dia, os animais foram submetidos ao exercício de natação por 5 minutos, suportando uma carga de 3% de seu peso corporal, com acréscimos de 5 minutos a cada dia, quando, no décimo quinto dia, a adaptação foi encerrada. O recipiente no qual os animais realizaram a natação foi um tanque cilíndrico profundo medindo 60cm X 120cm, com superfície lisa, utilizado para impossibilitar o animal de atingir seu fundo, permanecendo caminhando submerso ou saltando.

É importante ressaltar que habilidade de nadar é inerente ao rato, porém a sensação do animal sentir-se preso na piscina pode promover estresse de contenção. Por isso, a adaptação padronizada e sistemática consiste em “ensinar” o animal que, da mesma forma com que foi colocado no ambiente aquático, será retirado, reduzindo o possível fator estressor.

3.3.b. Adaptação à esteira rolante

A esteira rolante para ratos utilizada foi composta por oito baias distintas, com controle manual ou automático de velocidade e inclinação do equipamento.

Anteriormente ao processo de adaptação dos animais à esteira rolante, houve a necessidade de seleção prévia dos ratos “corredores” para a composição da amostra, com duração de dez dias. Após detecção, os selecionados realizaram a adaptação, composta por 10

dias de exercício em sessões com velocidades crescentes (5-15 m/min) e duração máxima de atividade diária de 20 minutos.

3.3.1. Teste progressivo para a determinação do LAn

3.3.1.1. Natação

Para a determinação do limiar anaeróbio em ratos, foi utilizado um protocolo de cargas progressivas, que consistiu de seis cargas distintas de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5% do peso total do animal, com duração de cinco minutos cada uma. Ao final de cada estágio, foram coletadas amostras sanguíneas da extremidade distal da cauda dos animais, como posteriormente será descrito. O tempo máximo de permanência do rato fora da água para a realização das coletas sanguíneas foi de 30 segundos.

Para identificar o limiar anaeróbio através da concentração fixa de lactato sanguíneo em 5,5mmol/L, sugerido por Gobatto et al. (2001), foi plotado um gráfico contendo o eixo x a carga (% peso corporal) versus lactacidemia (mmol/L). Os pontos obtidos foram ajustados por uma equação exponencial de segunda ordem, a partir da qual encontramos a carga correspondente à concentração sanguínea de lactato de 5,5mmol/L. Da mesma maneira, identificamos também o LAn para concentrações fixas equivalentes à 4,0; 4,5 e 5,0mmol/L.

Para a verificação de possível estabilização do lactato nessa intensidade, os animais foram submetidos à exercício contínuo em intensidade equivalente a 100%, 90% e 110% do LAn 5,5mmol/L, com coletas sanguíneas efetuadas a cada cinco minutos de exercício. O intervalo de 48 horas foi mantido entre as cargas e a ordem de realização dos três esforços foi aleatória.

As análises acima descritas foram efetuadas pelo pacote matemático “*Origin*”, versão 6.0.

3.3.2.2. Esteira rolante

O procedimento de determinação do limiar anaeróbio na esteira rolante ocorreu de maneira semelhante ao descrito para o exercício de natação, porém com incremento da intensidade efetuado pela manipulação da velocidade de corrida. As velocidades utilizadas foram de 15, 20, 25, 30 e 35 m/min, com a duração de cinco minutos cada uma e coletas de sangue ao final de cada estágio.

A concentração fixa para a obtenção do LAn foi de 4,0mmol/L, como proposto por Pilis et al. (1993), para exercício de corrida em esteira rolante. Assim como em natação, também foi verificada a intensidade equivalente às concentrações fixas 4,5; 5,0 e 5,5 mmol/L.

3.3.2. Protocolo de potência crítica proposto por Monod e Scherrer (1965)

3.3.2.1. Carga crítica na natação

Em natação para ratos não é possível determinar a potência crítica devido à dificuldade de mensuração física de “potência” (carga versus velocidade), porém, é plausível realizar a quantificação sugerida pelo modelo inicial utilizando a carga suportada pelos animais durante o exercício. Para a determinação da carga crítica ($C_{crit_{MS}}$) e da capacidade de trabalho anaeróbio (CTA) pelo modelo de Monod e Scherrer (1965), os ratos foram submetidos a um protocolo preditivo composto por 4 testes, realizados em dias alternados, suportando cargas contínuas de 9, 11, 13 e 15% do peso corporal, distribuídas aleatoriamente. Para cada carga (C expressa em % do peso corporal), os ratos nadaram individualmente até a exaustão, a partir das quais foram obtidos os tempos limites de exercício, em segundos (t_{lim}) (Marangon et al., 2002). O critério de exaustão adotado foi a não manutenção dos padrões de movimento da natação por um período de 5 segundos, com o animal não mais retornando com sucesso à superfície da piscina.

Como já mencionado, os testes foram realizados em um tanque cilíndrico (60 cm de diâmetro x 120 cm de profundidade), com água mantida em $31\pm 1^\circ\text{C}$, especialmente construído para esse fim. Os aspectos mais importantes desse ergômetro são a grande profundidade e a superfície de contato com os ratos (faces do tanque) extremamente lisa, impedindo qualquer auxílio durante o exercício. Como na avaliação em seres humanos, a Ccrit e a CTA foram determinadas pela relação intensidade do exercício (Carga) pelo tempo de exaustão (t_{lim}) através da hipérbole retangular $t_{lim} = CTA / (Carga - Ccrit)$. Para o estabelecimento dos parâmetros Ccrit e CTA, foi utilizado o ajuste linear da hipérbole ($Cx1/t_{lim}$), com a Ccrit correspondente ao y-intercepto e a CTA ao coeficiente angular da reta de regressão (Hill, 1993). Para testar a consistência matemática do modelo hiperbólico em natação para ratos, foram considerados os coeficientes lineares (R^2) significativos para os ajustes ($P < 0,05$).

Com o intuito de verificar a estabilização da lactacidemia na Ccrit, foram aplicadas 3 diferentes intensidades de nado, com sobrecargas contínuas, correspondentes a 80% da Ccrit, 90% da Ccrit e 100% de Ccrit. Durante as intensidades anteriormente descritas, ocorreram coletas de $25\mu\text{L}$ de sangue da extremidade distal da cauda nos tempos repouso, 10, 15 e 20 minutos, para a posterior determinação do lactato sangüíneo. Os animais foram sacrificados após exercício exaustivo para posterior análise do glicogênio muscular.

O protocolo de determinação de carga crítica utilizando o modelo de Monod e Scherrer (1965) foi realizado em duas condições distintas: com os animais alimentados e após 12 horas de jejum. Essa manipulação ocorreu devido ao objetivo de identificar as possíveis alterações nos estoques de glicogênio muscular e valores de CTA nessas condições.

3.3.2.2. Velocidade crítica na esteira rolante

O procedimento adotado para a determinação dos parâmetros sugeridos por Monod e Scherrer (1965) foi semelhante ao utilizado na natação, porém, como a manipulação da intensidade em esteira rolante é realizada utilizando a velocidade, determinamos a velocidade crítica dos animais (V_{crit}). As quatro velocidades de exercício exaustivo utilizadas para essa avaliação foram 25, 30, 35 e 40 m/min, distribuídas aleatoriamente e em dias distintos. O critério de exaustão adotado foi a não realização dos padrões de movimento para corrida por 5 segundos, mesmo após estímulo sonoro na superfície traseira da esteira rolante. Cabe ressaltar que não houve a utilização do choque elétrico durante a execução dos protocolos desenvolvidos em esteira rolante.

O ajuste matemático adotado foi idêntico ao utilizado na natação, substituindo a carga por velocidade. Também foi realizado o teste de máxima fase estável de lactato na intensidade de V_{crit} , com os animais sacrificados após exercício (90%, 100% e 110% da velocidade crítica) para posterior análise do glicogênio muscular.

3.3.3. Protocolo de potência crítica proposto por Chassain

3.3.3.1. Carga crítica na natação

O protocolo de Chassain (1986), inicialmente sugerido para avaliação aeróbia em humanos, foi padronizado e validado no presente estudo, para natação de ratos.

Para isso, os animais foram submetidos a quatro testes de natação em intensidades distintas (4, 6, 7, 8% do peso corporal total), realizados com um intervalo de 48 horas e distribuídos aleatoriamente. Cabe ressaltar que a escolha dessas intensidades foi baseada em protocolo piloto, a partir do qual essas cargas foram destacadas como as mais adequadas para o fornecimento de interpolações lineares dos resultados. A característica desse protocolo é a realização de duplos esforços em mesma intensidade, com um período de recuperação entre eles.

Para humanos, dois esforços de 3 minutos são separados por um intervalo de 1,5 minutos. Em animais, os esforços apresentaram a duração de 5 minutos, com um intervalo de 2 minutos entre eles. Coletas sanguíneas foram efetuadas da mesma forma descrita para os outros protocolos, ocorrendo ao final do primeiro e segundo esforços.

Para cada uma das quatro intensidades foi obtido o valor de delta lactato, subtraindo a lactacidemia do primeiro esforço (LAC_{E1}) da concentração de lactato ao final do segundo esforço (LAC_{E2}). Portanto, a equação utilizada foi $\Delta LAC = LAC_{E2} - LAC_{E1}$. Com as variações das concentrações sanguíneas para cada carga, foi realizada uma interpolação linear que forneceu o valor de delta lactato “nulo”, equivalente a C_{crit} calculada pelo método Chassain (1986).

Para verificar a possível estabilização da lactacidemia na intensidade de C_{crit} , os ratos foram submetidos a exercício contínuo com duração de 25 minutos nas cargas 90%, 100% e 110% da C_{crit} , realizados em dias distintos, separados por um período de 48 horas e distribuídos aleatoriamente.

3.3.3.2. Velocidade crítica na esteira rolante

O protocolo de Chassain (1986) também foi padronizado para a corrida em esteira rolante de modo semelhante ao descrito para a natação, porém as velocidades dos duplos esforços foram 15, 20 e 25 m/min. A duração e intervalo dos esforços foi de 5 e 2 minutos, respectivamente, como realizado na natação.

4. ANÁLISES DOS RESULTADOS

4.1. Análises bioquímicas

4.1.1 Concentração de lactato sangüíneo

Em todos os procedimentos descritos foram coletados 25µL de sangue da extremidade distal da cauda dos animais, sendo armazenados em tubos eppendorf de 1,5ml contendo 50 µL de fluoreto de sódio a 1%, o que impede a coagulação sangüínea e continuidade da glicólise. As amostras de sangue para a obtenção da lactacidemia foram analisadas individualmente em Lactímetro YSI 1500 SPORT (Yellow Spring Inc, EUA). O procedimento de análise sangüínea para a determinação da lactacidemia foi mantido em todos os experimentos.

4.1.2. Glicogênio Muscular

Frações entre 26-35mg do músculo sóleo (ou gastrocnêmio) foram pesadas após o sacrifício do animal e imediatamente digeridas em banho a 100°C em 0,5ml de KOH 1N durante 20 minutos. Foram adicionados 20µl de solução saturada de Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado através de duas passagens de 2,5ml de etanol quente, seguido de centrifugação, com o sobrenadante sendo descartado. O glicogênio precipitado foi ressuspenso em 4ml de água e a determinação colorimétrica foi realizada em 1ml de extrato, 20µl de fenol a 80% e 2,0ml de ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 490nm. Soluções de glicose de concentração conhecida foram utilizadas para as curvas de calibração (Dubois et al., 1956).

4.2. Análise estatística

A análise dos resultados foi procedida com o auxílio dos pacotes estatísticos *STATISTICA*, versão 6.0 e *ORIGIN 6.0*, conforme os objetivos do estudo.

Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilks, para constatar a necessidade da utilização de estatística paramétrica.

As intensidades de LAn 5,5mmol/L, Ccrit_{MS} e Ccrit_{CH}, verificadas em natação e LAn 4,0mmol/L, Vcrit_{MS} e Vcrit_{CH} bem como a concentração de lactato sanguíneo nessas intensidades foram comparadas à MFEL e o valor de lactacidemia correspondente utilizando-se uma ANOVA one-way para medidas repetidas, precedida por post-hoc Newman Keuls, quando necessário. Além disso, a análise de Correlação de Pearson foi efetuada para esses parâmetros.

Para verificar os efeitos de 12 horas de jejum, quando esse procedimento foi realizado, as capacidades aeróbia (Ccrit) e anaeróbia (CTA) determinadas por modelo não invasivo nas duas condições alimentares (ratos alimentados e em jejum) foram comparadas com a utilização do teste-t de Student pareado. Para identificar possíveis distinções nos valores de glicogênio muscular em repouso e após exercício exaustivo, utilizou-se teste t não pareado.

Uma outra manipulação experimental efetuada na tese foi a alteração do ciclo de luminosidade claro-escuro no qual os animais eram mantidos e avaliados. No momento em que essa manipulação foi utilizada, um teste t-student para medidas indepententes foi aplicado para comparar as capacidades aeróbia e anaeróbia, determinadas em ciclo normal e ciclo invertido.

Para todas as análises, o nível de significância adotado foi $P < 0,05$ (Dawson-Saunders e Trapp, 1994).

5. RESULTADOS

Os resultados da presente tese serão apresentados na forma de artigos científicos publicados ou submetidos à publicação. Desse modo, por facilidade didática na ordem de apresentação dos manuscritos subseqüentes, enumeramos 8 estudos:

- **Estudo 1:** O primeiro estudo, intitulado “*Maximal lactate steady state in running rats*”, objetivou adaptar o protocolo considerado padrão ouro para avaliação aeróbia de humanos, à exercício de corrida em esteira rolante para ratos Wistar. Esse trabalho foi publicado no periódico “*Journal of exercise Physiology online* (Manchado et al., J Exerc. Physiol. online 8: 29-35, 2005) (ANEXO I).
- **Estudo 2:** “*Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos*” é o segundo estudo componente dessa tese. O estudo objetivou comparar a concentração de lactato sangüíneo em intensidade de máxima fase estável em exercícios de natação e esteira rolante. Com a realização desse trabalho foi possível concluir que, assim como observado em humanos, há diferença significativa da resposta lactacidêmica de ratos Wistar submetidos à dois distintos exercícios, indicando necessidade de cautela na aplicação de cargas de trabalho baseadas em

concentração fixa de lactato (Manchado et al., Rev Bras Med Esporte, 12(5): 259-262, 2006) (ANEXO II)

- **Estudo 3:** Intitulado “*Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats*”, o manuscrito refere-se à padronização do procedimento não exaustivo para a avaliação aeróbia em natação de ratos, inicialmente sugerido por Chassain (1986) para a determinação da capacidade aeróbia em humanos. Esse trabalho foi publicado no periódico “*Applied Physiology Nutrition and Metabolism*” (Manchado et al., Appl. Physiol. Nutr. Metab., 31: 731-736, 2006) (ANEXO III).

- **Estudo 4:** “*Non-invasive critical load determination in swimming rats: effects of muscle glycogen depletion*” objetivou estimar a intensidade de carga crítica em ratos nadadores a partir de uma avaliação simples e não invasiva, bem como investigar o parâmetro anaeróbio (capacidade de trabalho anaeróbio) sugerido pelo modelo matemático de potência crítica. Para essa investigação os animais avaliados foram submetidos a um processo de depleção dos estoques de glicogênio (jejum 12 horas), a partir do qual observamos as possíveis alterações nas determinações dos parâmetros aeróbio e anaeróbio sugeridos pelo modelo matemático. O resumo desse trabalho foi apresentado no 52nd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, realizado em Nashville-TN e, posteriormente publicado no periódico “*Medicine & Science and Sports & Exercise*”, v.37(5), p.S331, 2005. O trabalho completo, versão em língua inglesa, está em processo de análise no periódico “*Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*”.

- **Estudo 5:** O quinto estudo objetivou a padronização do modelo não invasivo inicialmente proposto por Monod e Scherrer (1965), para avaliação da velocidade crítica e capacidade de corrida anaeróbia de ratos Wistar sedentários. Esse procedimento foi desenvolvido em esteira rolante para animais de pequeno porte, sendo os ratos submetidos à exercícios exaustivos, em elevadas velocidades. O resumo desse trabalho foi apresentado no 53nd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, realizado em Denver-Colorado e, posteriormente publicado no periódico “Medicine & Science and Sports & Exercise”, v.38(5), p.S516, 2006 (ANEXO V). O trabalho completo está sendo analisado na revista “*Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*”.

- **Estudo 6:** O sexto trabalho componente dessa tese foi intitulado “*Double bouts test for non-exhaustive aerobic capacity evaluation of running rats*”. Esse estudo objetivou a adaptação do procedimento não exaustivo inicialmente proposto para avaliação aeróbia de humanos, em exercício executado em cicloergômetro, para mensuração da condição aeróbia de ratos corredores. O trabalho, em idioma inglês, foi submetido à publicação e aguarda resposta do periódico “*European Journal of Applied Physiology*”.

- **Estudo 7:** Na tentativa de verificarmos os possíveis efeitos do ciclo claro-escuro nas avaliações de capacidades aeróbia e anaeróbia, ratos corredores foram submetidos à avaliação não invasiva de velocidade crítica e capacidade de corrida anaeróbia em duas diferentes condições de luminosidade. Para isso, segregamos a amostra experimental

em dois grupos distintos, sendo um mantido em ciclo claro-escuro normal, com os animais sendo avaliados em período de luminosidade no laboratório, e outro submetido ao ciclo claro-escuro invertido, realizando esforços no período de escuridão. Esse estudo foi submetido ao periódico *“Physiology and Behavior”*.

- **Estudo 8:** A análise do limiar anaeróbio a partir de teste progressivo foi utilizada no estudo intitulado “Limiar anaeróbio em corrida e natação para ratos: determinação por concentração fixa de lactato e bissegmentação da curva lactacidêmica”. Nesse trabalho a proposta foi identificar o melhor método matemático para avaliação de intensidade aeróbia com a utilização de incrementos de carga em natação e corrida para ratos. O estudo será vertido para o inglês e posteriormente enviado ao periódico *“Medicine & Science and Sports & Exercise”*.

ESTUDO 1

MÁXIMA FASE ESTÁVEL DE LACTATO EM RATOS CORREDORES

MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING RATS

Fúlvia de Barros Manchado^{1,2}, Claudio Alexandre Gobatto¹, Ricardo Vinícius Ledesma
Contarteze¹, Marcelo Papoti^{1,3}, Maria Alice Rostom de Mello¹

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP , Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil

2- Faculdades Integradas Einstein de Limeira- Fiel, Limeira – São Paulo - Brasil

3- Faculdades Integradas de Bauru – São Paulo - Brasil

Manchado et al., Journal of Exercise Physiology online 8: 29-35, 2005

RESUMO

A mais alta concentração de lactato durante um exercício na qual a produção de lactato sanguíneo é igual à sua remoção é denominada “máxima fase estável de lactato (MFEL)”. Essa intensidade é considerada um importante indicador de capacidade aeróbia, sendo considerada padrão ouro para avaliação aeróbia de humanos. O objetivo do presente estudo foi determinar a máxima fase estável de lactato em ratos corredores adultos. Para isso, ratos Wistar machos e adultos foram selecionados e adaptados, por um período de três semanas, à corrida em esteira rolante. Após familiarização inicial com o ergômetro, os ratos foram submetidos à testes de corrida em intensidades equivalentes à 15, 20, 25, 30 e 35 m/min. A seqüência de velocidades foi distribuída aleatoriamente. Cada teste consistiu na realização de corridas contínuas por 25 minutos em cada velocidade ou até a exaustão voluntária do animal. O lactato sanguíneo foi determinado no repouso e a cada cinco minutos de exercício contínuo para posterior determinação da MFEL. Os ratos corredores apresentaram MFEL em 20 m/min, com concentração média de estabilização desse metabólito à $3,9 \pm 0,3$ mmol/L. Em velocidade 15 m/min, também houve estabilização do lactato, porém em menor concentração ($3,2 \pm 0,3$ mmol/L). Houve um aumento progressivo na lactacidemia em intensidade superior e alguns animais atingiram a exaustão entre o 10º e 25º minuto de exercício. Esses resultados indicam que o protocolo de MFEL pode ser utilizado para a determinação da máxima intensidade aeróbia de ratos corredores.

Palavras-chave: Lactato sanguíneo, máxima intensidade de exercício aeróbio, ratos corredores

ABSTRACT

The higher concentration during exercise at which lactate entry in blood equals its removal is known as "maximal lactate steady state" (MLSS) and is considered an important indicator of endurance exercise capacity. The aim of the present study was to determine MLSS in running rats. Adult male Wistar sedentary rats, which were selected and adapted to treadmill running for three weeks, were used. After becoming familiarized with treadmill running, the rats were submitted to five exercise tests at 15, 20, 25, 30 and 35 m/min velocities. The velocity sequence was distributed at random. Each test consisted of continuous running for 25 min at one velocity or until the exhaustion. Blood lactate was determined at rest and each 5 min of exercise to find the MLSS. The running rats presented MLSS at the 20 m/min velocity, with blood lactate of 3.9 ± 0.3 mmol/L. At the 15 m/min velocity, the blood lactate also stabilized, but at a lower concentration (3.2 ± 0.3 mmol/L). There was a progressive increase in blood lactate concentration at higher velocities, and some animals reached exhaustion between the 10th and 25th minute of exercise. These results indicate that the protocol of MLSS can be used for determination of the maximal aerobic intensity in running rats.

Key Words: blood lactate, maximal aerobic exercise intensity, running rats

INTRODUÇÃO

A determinação da zona de transição metabólica na qual há passagem da predominância aeróbia para anaeróbia, caracterizada por um aumento de contribuição fosfagênica e glicolítica para o fornecimento de energia ao exercício, apresenta extrema importância para a avaliação física, condicionamento físico e esportes de rendimento. Como consequência, um grande número de investigações vem sendo conduzido nas últimas décadas, resultando em diferentes protocolos para identificação dessa zona metabólica de transição.

Wasserman e McIlroy (1964) foram os primeiros autores a definirem o termo limiar anaeróbio, constatando que durante o exercício intenso há um abrupto aumento nas concentrações sanguíneas de CO_2 , refletindo em aumento da contribuição do metabolismo anaeróbio. Kindermann et al. (1979), após realizarem testes caracterizados por esforços incrementais em atletas bem treinados, postularam a existência da transição metabólica aeróbia-anaeróbia em intensidades de exercício apresentando concentrações de lactato entre 2,0 e 4,0 mmol/L, com o limiar anaeróbio ocorrendo à 4,0 mmol/L. Em 1976, Mader et al. (1986) sugeriram que o limiar anaeróbio corresponde ao aumento desproporcional nas concentrações sanguíneas de lactato em resposta a uma carga de exercício. Posteriormente Sjodin e Jacobs (1981) e Heck et al. (1985) consideraram o nível de lactato sanguíneo de 4,0 mmol/L como o mais alto acúmulo de lactato sanguíneo (OBLA). Outros protocolos mais simples vêm sendo padronizados para determinar a zona metabólica de transição aeróbia-anaeróbia. Dentre eles é possível citar o lactato mínimo descrito por Tegtbur et al. (1993), o método de duplos esforços de exercício sugerido por Chassain (1986) com base nos valores dos deltas de frequência cardíaca (FC) e VO_2 e lactato sanguíneo, e o protocolo não invasivo, porém exaustivo, proposto por Monod e Scherrer (1965), denominado modelo de potência crítica. Apesar de inúmeros os protocolos propostos nas últimas décadas, a máxima fase estável de lactato (MFEL) é

considerada como método “padrão ouro” para a determinação da intensidade correspondente à zona de transição aeróbia-anaeróbia (Beneke et al., 1995; Baldari et al., 2000; Beneke et al., 2003; Billat et al., 2003,).

Por diversas e óbvias limitações em investigações com humanos, um número significativo de estudos com exercício tem sido conduzido em animais laboratoriais, especialmente em ratos, com a concentração de lactato sangüíneo apresentando-se como importante ferramenta para a determinação da intensidade de exercício. Entretanto, há uma grande lacuna referente à cinética do lactato sangüíneo desses animais. Em natação, uma série de experimentos vem sendo desenvolvida por nosso grupo de pesquisa objetivando analisar a cinética desse metabólito. Inicialmente, Gobatto et al. (1991) demonstraram que o teste de incrementos de carga em natação não foi apropriado para determinação do limiar anaeróbio. Posteriormente, foi realizada a adaptação do teste de máxima fase estável de lactato ao exercício de natação para ratos (Gobatto et al., 2001). A concentração de lactato correspondente à MFEL foi 5,5 mmol/L para ratos sedentários (Gobatto et al., 2001). O limiar anaeróbio de ratos em natação também foi determinado por Voltarelli et al. (2002), com a utilização do protocolo de lactato mínimo inicialmente proposto por Tegtbur et al. (1993) para avaliação humana.

Por ser demasiadamente utilizada em estudos com animais, a corrida e esteira rolante é uma importante modalidade de exercício envolvendo ratos. Pills et al. (1993) analisaram a concentração de lactato sangüíneo de ratos durante teste de multiestágio (ou incremental) realizado em esteira rolante e, com esse procedimento, calcularam o limiar anaeróbio (LAN) desses animais. Nesse estudo, a cinética do lactato sangüíneo apresentou comportamento similar à observada em humanos utilizando mesmo ergômetro e o LAN foi observado à velocidade de 25m/min, com concentração de lactato em 4,0 mmol/L. Recentemente, Billat et al. (2005)

também determinaram, em esteira rolante, a velocidade crítica de camundongos de acordo com o modelo não invasivo proposto por Monod e Scherrer (1965).

Apesar da MFEL obtida em exercício contínuo ser utilizada para validar muitos protocolos de avaliação e considerada o melhor método para identificar a zona de transição aeróbia-anaeróbia de esforço, não existem, na literatura, estudos que determinaram a MFEL em ratos corredores. Dessa forma, o presente estudo objetivou determinar a máxima fase estável de lactato em ratos sedentários submetidos à exercício de corrida em esteira rolante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Onze ratos Wistar adultos (80 dias) não treinados, com peso corporal 250-320g no início do experimento e 410-500g ao final foram selecionados e utilizados no estudo. Durante o período experimental, os animais receberam água e ração comercial para roedores (Labina-Purina) *ad libitum*. Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola), em um Biotério com ciclo claro e escuro (6:00hs até 18:00hs) e temperatura controlada (25°C). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas éticas propostas pelo Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) para experimento com animais.

Seleção e adaptação dos ratos corredores

O processo de seleção dos ratos corredores ocorreu em dez dias consecutivos, com os animais correndo a 15m/min, por cinco minutos. Foram selecionados para compor a amostra, os ratos que apresentaram resposta positiva ao estímulo por nove ou dez vezes. Posteriormente, os animais selecionados foram adaptados ao exercício de corrida em esteira rolante. A adaptação

consistiu na execução de corrida por três semanas, 5 dias/semana, com duração e velocidade sendo progressivamente aumentadas. A proposta da adaptação foi a redução do estresse dos animais frente ao exercício sem promoção de adaptações fisiológicas advindas do treinamento físico.

Procedimento Experimental

Após familiarização com a corrida em esteira, os ratos foram submetidos a cinco testes contínuos em velocidades equivalentes a 15, 20, 25, 30 e 35 m/min. Cada animal realizou os cinco testes, com intervalo de 72 horas entre eles. A seqüência de velocidades foi distribuída randomicamente e uma mesma velocidade não foi novamente aplicada a um mesmo rato. Cada teste consistiu da realização de 25 minutos de corrida contínua na velocidade estipulada ou exercício até a exaustão. Para possível determinação da curva lactacidêmica em cada intensidade, amostras sangüíneas foram extraídas da cauda dos ratos em seis momentos: no início e a cada 5 minutos de execução dos testes.

Amostras sangüíneas e análises

Amostras de sangue (25 µl) foram extraídas da extremidade distal da cauda dos ratos durante os testes e posteriormente depositadas em tubos Eppendorf (1,5 ml) contendo 50 µl de fluoreto de sódio (1%). As concentrações de lactato sangüíneo foram analisadas em lactímetro (YSI modelo 1500 SPORT).

Cálculos

Gráficos individuais das concentrações de lactato sangüíneo obtidas durante exercício em cinco diferentes intensidades foram plotados para determinação da MFEL. A mais alta

velocidade de corrida na qual houve um aumento igual ou inferior 1 mmol/L do 10^o ao 25^o minuto de exercício foi considerada como equivalente a MFEL (Beneke et al., 2003, Gobatto et al., 2001).

Análise Estatística

O procedimento estatístico consistiu da aplicação de Anova-One Way, seguida por teste post-hoc Newman-Kewls, quando necessário (Dawson-Sanders e Trapp, 1994). Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5% .

RESULTADOS

Todos os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Os animais apresentaram máxima fase estável de lactato em concentração lactacidêmica $3,9 \pm 0,3$ mmol/L, na velocidade 20 m/min, com esses valores variando de 3,0 à 4,5mmol/L A 15 m/min, também houve estabilização do lactato sanguíneo, porém em menores concentrações ($3,2 \pm 0,3$ mmol/L). Um progressivo aumento de lactato foi observado em intensidades superiores e em alguns animais atingiram a exaustão entre o 10^o e 25^o minuto de exercício (Figura 1.1).

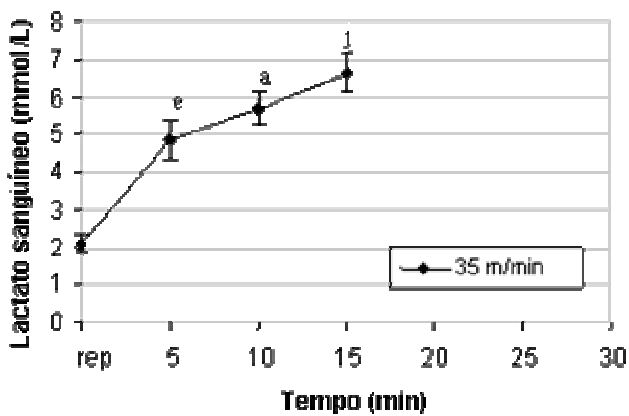
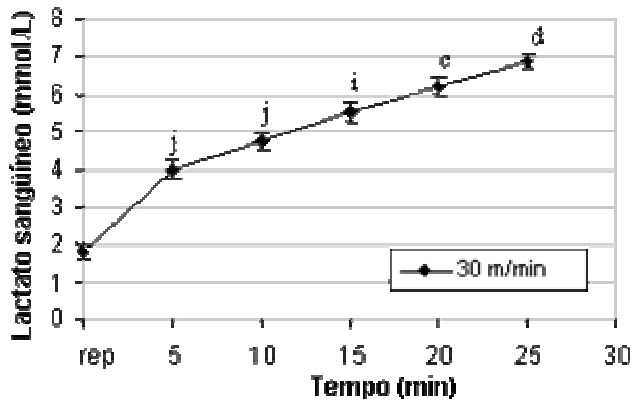
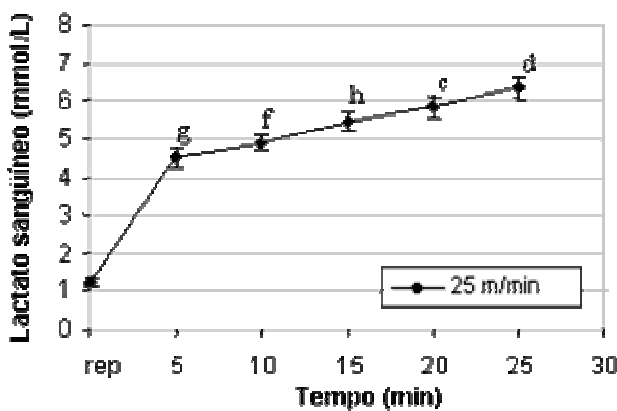
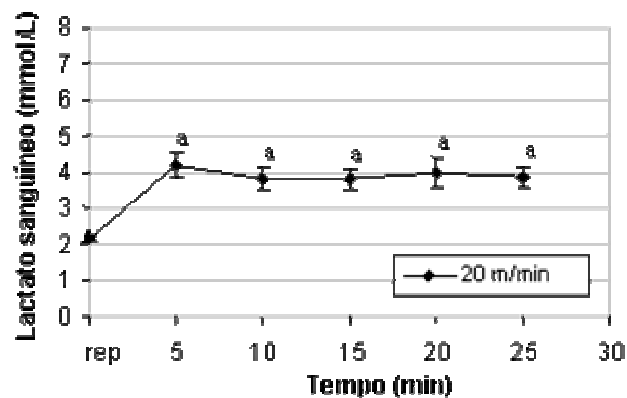
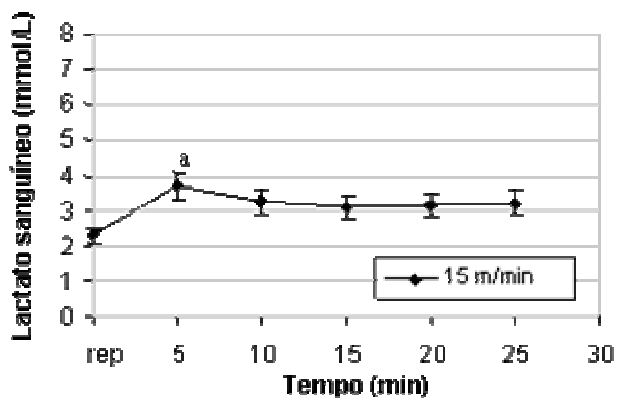


Figura 1.1. Concentrações de lactato sanguíneo durante teste de corrida contínua a 15m/min (n=10), 20 m/min (n=11), 25 m/min (n=10), 30 m/min (n=10) e 35 m/min (n=8). Os resultados estão expressos em média \pm epm. Em cada gráfico, as diferenças significantes ($P < 0,05$) são: a) vs. valores de repouso; b) vs. repouso e 5 min de exercício; c) vs. repouso, 5 e 10 min de exercício; d) vs. repouso, 5, 10 e 15 min de exercício; e) vs. repouso, 5 e 15 min de exercício; f) vs. repouso, 20 e 25 min de exercício; g) vs. repouso, 15, 20 e 25 minutos de exercício; h) vs. repouso, 5 e 25 min de exercício; i) vs. repouso, 5, 10 e 25 min de exercício; j) vs. repouso e todos os outros minutos de exercício avaliados.

DISCUSSÃO

A concentração sanguínea de lactato foi bem definida no último século como um excelente indicador da predominância de fornecimento energético para o exercício realizado (Hill et al., 1924). Desde então, tem sido muito utilizada para a avaliação e prescrição de treinamento físico para humanos. Recentemente, o lactato sanguíneo vem sendo utilizado para a determinação da intensidade de exercício em animais, porém, apesar da importância, existem poucos estudos associando lactacidemia sanguínea e ratos exercitados (Gobatto et al., 1991; Voltarelli et al., 2002).

A máxima fase estável de lactato pode ser utilizada para detectar a mais alta intensidade de exercício suportada sem aumento contínuo das concentrações de lactato sanguíneo (Heck et al., 1985; Beneke et al., 1995; Pringle e Jones, 2002) por representar o mais alto ponto de equilíbrio entre a produção e remoção do lactato (Billat et al., 2003). Esse parâmetro é considerado um bom indicador da capacidade aeróbia (Jones e Carter, 2000; Billat et al., 2003) e a razão de trabalho associada à MFEL pode ser utilizada no treinamento de resistência aeróbia de atletas de elevado desempenho esportivo (Baldari et al., 2000; Almarwaey et al., 2004).

No presente estudo foi possível observar que a máxima fase estável de lactato pode ser facilmente identificada em ratos corredores, já que a cinética de lactato parece reportar comportamento similar ao obtido com humanos, durante exercício de corrida contínua.

A velocidade associada à máxima fase estável de lactato em nossos animais foi 20m/min. Em intensidades superiores, as concentrações sanguíneas de lactato apresentaram aumento progressivo e alguns ratos não suportaram a manutenção do exercício. A máxima intensidade de exercício com predominância energética aeróbia observada no presente estudo foi menor que a descrita por Pilis et al. (1993) (25 m/min), obtida por um protocolo diferente. Nesse último estudo, os autores determinaram a o limiar anaeróbio (LAn) em ratos corredores utilizando um

teste progressivo de multiestágio em esteira rolante. O LAn foi estimado através de gráficos individuais do lactato sangüíneo vs. velocidade de corrida, sendo considerado como a intensidade de exercício na qual a lactacidemia apresentou rápido e brusco aumento. Langfort et al. (1996) também reportaram similar intensidade de LAn para ratos sedentários, calculado como a velocidade de corrida correspondente ao ponto individual de aumento abrupto da curva de lactato utilizando duas regressões lineares (25 m/min).

Apesar de Pilis et al. (1993) e Langfort et al. (1996) descreverem a possibilidade de determinação do LAn utilizando protocolo progressivo em esteira rolante, Gobatto et al. (1991) não obtiveram cinética de lactato sangüíneo esperada durante teste incremental em natação de ratos Wistar. Esses autores observaram a MFEL na natação em diferente intensidade, concluindo que, em exercício contínuo submáximo, as concentrações de lactato sangüíneo parecem mostrar um comportamento de estabilização esperado.

O mais importante achado do presente estudo encontra-se na concentração de estabilização do lactato em 3,9 mmol/L, valor esse similar ao observado em protocolos experimentais de corrida aplicados à humanos de distintas idades (Heck et al, 1985; Billat et al., 1994; Billat et al., 1995; Beneke et al., 1996). Do mesmo modo, os níveis de lactato no sangue obtidos por método de MFEL foram equivalentes à concentração de inflexão lactacidêmica descrita por Pilis e Langfort em ratos Wistar corredores, a partir de protocolo de incremento de velocidades. Na natação, Gobatto et al. (2001) reportaram MFEL em concentração lactacidêmica superior (5,5 mmol/L), observada à 5% do peso corporal de ratos sedentários. Voltarelli et al. (2002) também encontraram intensidade metabólica de transição aeróbia-anaeróbia similar utilizando o método lactato mínimo, porém a concentração de lactato equivalente à essa intensidade foi superior aos

demais estudos já desenvolvidos ($7,17 \pm 0,16$ mmol/L). Isso suporta a hipótese de que os valores lactacidêmicos em intensidade de LAn parecem ser protocolo-dependentes.

Em resumo, ratos não treinados submetidos à exercícios contínuos de corrida apresentam máxima fase estável de lactato em velocidade de 20m/min, com concentração de lactato sanguíneo média de 3,9 mmol/L. Em intensidades inferiores, há estabilização da cinética de lactato em menores concentrações. Um progressivo aumento é observado em velocidades superiores. Dessa forma, o teste de máxima fase estável de lactato pode ser utilizado para a determinação da intensidade de transição metabólica de ratos corredores.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi suportado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP – Proc. 04/07070-5) e “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq – Proc. 300270/2004-6). Agradecemos à Clarice Yoshio Sibuya, Eduardo Custódio e José Roberto Rodrigues da Silva, que providenciaram auxílio essencial para o desenvolvimento desse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMARWAEY, O. A.; JONES, A. M.; TOLFREY, K. Maximal lactate steady state in trained adolescent runners. **J Sports Sci**, v.22(2), p.215-25. 2004
2. BALDARI, C.; GUIDETTI, L. A simple method for individual anaerobic threshold as a predictor of maximal lactate steady state. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.1798-802, 2000.

3. BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc**, v.27(6), p.863-7, 1995.
4. BENEKE R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v. 89, p.95-9, 1995.
5. BENEKE, R.; HECK, H.; SCHWARZ, V.; LEITHAUSER, R. Maximal lactate steady state during the second decade of age. **Med Sci Sports Exerc**, v.28, p.1474-8, 1996.
6. BILLAT, V. L.; DALMAY, F.; ANTONINI, M. T. A method for determining the maximal steady state of blood lactate concentration from two levels of submaximal exercise. **Eur J Appl Physiol**, v.69, p.196-202, 1994.
7. BILLAT, V. L.; GRATAS-DELAMARCHE, A.; MONNIER, M.; DELAMARCHE, P. A test to approach maximal lactate steady-state in 12-years old boys and girls. **Arch Physiol Biochem**, v.103, p.65-72, 1995.
8. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v.33(6), p.407-26, 2003.
9. BILLAT, V. L.; MOUISEL, E.; ROBLOT, N.; MELKI, J. Inter- and intra-strain variation in mouse critical running speed. **J. Appl. Physiol**, v.98(4), p.1258-63, 2005.
10. CHASSAIN, A. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme á l'effort: application á la mesure des puissances de la fréquence cardiaque et de la lactatémie. **Science & Sports**, v.1, p.41-8, 1986.

11. DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP R.G. **Basic and clinical biostatistic**. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.
12. GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C. Y.; MELLO, M. A. R. 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, p.725-6, 1991.
13. 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. **Comp Biochem Physiol**, v.130A, p.21-7, 2001.
14. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. **Int J Sports Med**, v.6, p.117-30, 1985.
15. HILL, A. V.; LONG, C. N. H.; LUPTON, H. Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen: parts IV-VI. **Proc Roy Soc B**, v.97, p.84-138, 1924.
16. JONES, A. M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Med** , v.29, p.373-6, 2000.
17. KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol**, v.42, p.25-34, 1979.
18. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v. 14 A, p.51-5, 1996.

19. MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int J Sports Med**, v.7, p.45-65, 1986.
20. MONOD, H.; SCHERER J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics** v.8, p.329-38, 1965.
21. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106A, p.285-9. 1993.
22. PRINGLE, J. S. M.; JONES, A. M. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. **Eur J Appl Physiol**, v.88, p.214-26, 2002.
23. SJÖDIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int J Sports Med**, v.2, p.23-6, 1981.
24. TEGTBUR, U.; BUSSE, M.W.; BRAUMANN, K. M.. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v.25, p.620-7, 1993.
25. VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.
26. WASSERMAN, K.; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in CARDIAC PATIENTS DURING EXERCISE. **Am J Cardiol**, V.14; P. 844-852, 1964.

ESTUDO 2

MÁXIMA FASE ESTÁVEL DE LACTATO É ERGÔMETRO-DEPENDENTE EM MODELO EXPERIMENTAL UTILIZANDO RATOS

MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IS ERGOMETER-DEPENDENT IN EXPERIMENTAL MODEL USING RATS

Fúlvia de Barros Manchado^{1,2}, Claudio Alexandre Gobatto¹, Ricardo Vinícius Ledesma
Contarteze¹, Marcelo Papoti^{1,3}, Maria Alice Rostom de Mello¹

¹ Universidade Estadual Paulista - UNESP. Departamento de Educação Física, Rio Claro/SP, Brasil

² Faculdades Integradas Einstein de Limeira - FIEL. Limeira/SP, Brasil

³ Faculdades Integradas de Bauru – FIB. Bauru/SP, Brasil

Manchado et al., Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 12(5): 259-262, 2006.

RESUMO

A máxima fase estável de lactato (MFEL) é considerada padrão ouro para a determinação da intensidade de transição metabólica aeróbia-anaeróbia em exercício contínuo, porém a resposta lactacidêmica nessa intensidade é, em humanos, dependente do ergômetro utilizado na avaliação. Uma ferramenta importante para estudos em fisiologia e áreas correlatas é a aplicação de modelos experimentais utilizando animais. Entretanto, ainda são restritas as pesquisas destinadas a investigar protocolos de avaliação em ratos. O objetivo do estudo foi verificar se a MFEL é dependente do ergômetro utilizado para a avaliação aeróbia de ratos. Para isso, 40 ratos Wistar adultos foram avaliados em dois diferentes exercícios: natação e corrida em esteira. Em ambos, a MFEL foi verificada após aplicação de 4 testes contínuos, em diferentes intensidades, com duração de 25 minutos, separados por intervalo de 48 horas. Em todos os testes houve coleta sanguínea da cauda dos animais a cada 5 minutos de exercício para análise do lactato sanguíneo. Os testes de natação ocorreram em tanque cilíndrico profundo, com a temperatura da água a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$. As cargas adotadas para os testes foram 4,5; 5,0; 5,5; 6,0% do peso corporal, atadas ao dorso dos animais. Para a determinação da MFEL em corrida, houve seleção dos ratos corredores e as velocidades dos testes foram de 15, 20, 25, 30m/min. A MFEL foi interpretada como a mais alta intensidade de exercício na qual o aumento da lactacidemia foi igual ou inferior à 1mmol/L, do 10º ao 25º minuto. Anova one-way identificou diferenças entre as concentrações de lactato sanguíneo nos diversos tempos de exercício e ergômetros. A MFEL na natação ocorreu a 5,0% pc, em concentração de lactato de $5,20\pm 0,22\text{mmol/L}$. Para o exercício em esteira rolante, observou-se MFEL a 20m/min, em concentração $3,87\pm 0,33\text{mmol/L}$. Dessa forma, é possível concluir que a MFEL também é ergômetro-dependente em modelos experimentais utilizando animais.

Palavras-chave: lactato sanguíneo, natação, corrida, ratos Wistar

ABSTRACT

The maximal lactate steady state (MLSS) is considered the “gold standard” method for determination of aerobic/anaerobic metabolism transition during continuous exercise, but the blood lactate response at this intensity is ergometer-dependent in human beings. An important tool for exercise physiology and correlated areas studies is the use of animal models. However, investigations on evaluation protocols in rats are scarce. The aim of the present study was to verify if the MLSS is ergometer-dependent for the evaluation of the aerobic conditioning of rats. For this, 40 adult male Wistar rats were evaluated in two different exercise types: swimming and treadmill running. In both, the MLSS was obtained with 4 continuous 25 minutes tests, at different intensities, performed in intervals of 48 hours. Blood samples were collected from a cut at the tail tip during all tests every 5 minutes for blood lactate analysis. The swimming tests occurred in a cylindrical tank with smooth surface, with water temperature kept at $31\pm 1^{\circ}\text{C}$. The loads used in the tests were 4.5; 5.0; 5.5 and 6.0% of the body weight tied to the back at the rat. For MLSS determination in running exercise, there was selection of running rats and velocities used in the tests were 15, 20, 25 and 30m/min. The MLSS was understood as an increase not exceeding 1.0mmol/L of blood lactate, from the 10th to the 25th minute of exercise. The MLSS in swimming exercise occurred at 5.0%bw, with blood lactate at $5.20\pm 0.22\text{mmol/L}$. The running rats presented MLSS at the 20m/min velocity, with blood lactate of $3.87 \pm 0.33\text{mmol/L}$. The results indicated that the MLSS is ergometer-dependent in experimental models using animals, as in human beings.

KEY WORDS: blood lactate, swimming, treadmill running, Wistar rats

INTRODUÇÃO

A determinação da predominância metabólica para o fornecimento de energia durante um exercício apresenta extrema importância para a correta prescrição da atividade. Nesse sentido, muitos são os protocolos de avaliação propostos para detectar a intensidade de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio (Wasserman e McIlroy, 1964; Monod e Scherrer, 1965; Kinderman et al., 1979; Sjödín e Jacobs, 1981; Chassain, 1986 e Tegtbur et al., 1993).

Ao longo dos anos, a fisiologia do exercício e áreas correlatas vêm desenvolvendo metodologias simples e complexas, buscando a determinação da intensidade de esforço. Segundo Gaesser e Poole (1996), as respostas fisiológicas frente ao exercício sinalizam, de forma fidedigna, a característica do metabolismo predominante do fornecimento de energia para a dada atividade. Dentre essas respostas é possível destacar a lactacidemia sangüínea.

A máxima fase estável de lactato (MFEL), definida como a mais alta intensidade na qual o metabolismo aeróbio ainda prepondera sobre o anaeróbio, é considerada, na atualidade, o método padrão ouro para a determinação da intensidade de transição entre esses metabolismos em exercício contínuo executado por humanos (Beneke, 1995; Beneke, 2003, Billat et al., 2003). Segundo Beneke et al. (1995), a resposta lactacidêmica nessa intensidade é dependente do ergômetro utilizado por esses indivíduos, o que implica em cuidados na generalização de informações equivocadas à cargas de treinamento prescritas pela concentração de lactato sangüíneo.

A importância em determinar com precisão a intensidade de exercício não está resumida apenas aos trabalhos nos quais seres humanos são objetos de estudo. Uma ferramenta que tem se mostrado interessante para a observação do organismo frente ao esforço é a utilização de

modelos experimentais com animais, elaborados para simular situações, fisiopatológicas ou relacionadas ao treinamento, ocorridas com humanos, solucionando eventuais problemas decorrentes das alterações observadas (Oliveira et al., 2005; Braga et al., 2004; Murdes et al, 2004).

Com esse propósito, Gobatto et al. (2001) avaliaram a MFEL em ratos sedentários adaptados ao meio líquido, submetidos ao exercício de natação, como proposto por Heck et al. (1985) para avaliação de humanos. Para isso, os animais realizaram 20 minutos de esforços contínuos em intensidades correspondentes a 5, 6, 7, 8, 9 e 10% de seu peso corporal, atadas ao dorso, com coletas sanguíneas sendo realizadas a cada cinco minutos, para posterior determinação da lactacidemia. Os autores observaram MFEL em intensidade correspondente à 6% do peso corporal, com a concentração de estabilização de 5,5 mmol/L. Esse valor é diferente e superior ao reportado para humanos em distintos exercícios e para ratos realizando esforço em esteira rolante (aproximadamente 4mmol/L). Em revisão recente sobre a máxima fase estável de lactato, Billat et al. (2003) apontam como representativos para estudos com animais, os achados de Gobatto et al. (2001).

Outros protocolos de avaliação de rato vêm sendo desenvolvidos em natação, tais como a determinação da carga crítica e capacidade de trabalho anaeróbio (Marangon et al., 2002) e teste de lactato mínimo (Voltarelli et al., 2002). Entretanto, devido à grande importância, todos utilizam a MFEL como padrão ouro para a validação de seus procedimentos.

A esteira rolante é um outro ergômetro bastante utilizado para o treinamento de ratos e, sendo assim também é de extrema importância a detecção da intensidade de esforço em exercício de corrida. Em 1993, Pilis e colaboradores propuseram a aplicação de teste incremental e observação da resposta lactacidêmica para avaliação aeróbia de ratos corredores, baseando-se nos conceitos de limiar anaeróbio (LAN) sugerido para humanos (Sjodin e Jacobs, 1981). Desse

modo, os animais realizaram um teste caracterizado pelo aumento progressivo da velocidade, com estágios de cinco minutos e coletas de sangue ao final de cada carga, com posterior determinação do limiar anaeróbio por análise do comportamento exponencial da curva lactacidêmica. O limiar anaeróbio dos ratos foi obtido à 25m/min, em concentração de lactato 4mmol/L. Os resultados desse estudo revelaram comportamento do lactato sanguíneo similar ao descrito para humanos, inclusive com igual concentração associada ao LAn. Apesar disso, na natação de ratos, Gobatto et al. (1991) não encontraram esse clássico comportamento exponencial da curva de lactato sanguíneo, o que sugere a necessidade de maiores investigações acerca da cinética de lactato em animais submetidos a exercício físico e a distinção de respostas do lactato em diferentes ergômetros.

Devido à importância do método denominado máxima fase estável de lactato e para prevenção de equívocos na prescrição de atividade para animais em diferentes tipos de exercício, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a máxima fase estável de lactato, assim como em humanos, também é dependente do ergômetro utilizado para a avaliação aeróbia de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a política do Colégio Americano de Medicina do Esporte e aprovados pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP Rio Claro. Quarenta ratos da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, pesando 443 ± 33 g, foram utilizados. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco ratos por gaiola) em uma sala iluminada com ciclo claro-escuro de 12:00-12:00hs e temperatura de 25°C. Os ratos receberam ração comercial própria para roedores (Labina-Purina) e água *ad libitum*.

Protocolo Experimental

Adaptação ao meio líquido

Vinte animais foram submetidos a testes de máxima fase estável em exercício de natação. Anteriormente à realização dos testes, os ratos foram adaptados ao meio líquido de forma padronizada. A adaptação ocorreu no período total de 15 dias ininterruptos, em um tanque cilíndrico com superfície lisa, medindo 60cm de diâmetro por 120cm de profundidade (Marangon et al., 2001), com a temperatura da água mantida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Harri & Kuusela, 1986). O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal sem, entretanto, promover adaptações fisiológicas decorrentes do treinamento físico.

Inicialmente os ratos foram inseridos em água rasa por três dias, durante quinze minutos. Posteriormente, o nível da água foi aumentado, bem como o tempo de duração do esforço e a carga a ser sustentada pelo animal. Assim, no quarto dia, os ratos nadaram em água profunda por dois minutos, com acréscimo de dois minutos a cada dia até o décimo dia de adaptação. No décimo primeiro dia, os animais foram submetidos ao exercício de natação por cinco minutos suportando uma carga de 3% de seu peso corporal, com acréscimos de cinco minutos a cada dia, quando, no décimo quinto dia, encerrou-se a adaptação.

Seleção dos ratos corredores e adaptação à esteira rolante

Para a realização dos testes em esteira houve a necessidade de seleção prévia dos animais corredores. A seleção ocorreu em um período de sete dias, nos quais foram escolhidos os 20 ratos que apresentaram resposta positiva ao estímulo de corrida ao menos cinco vezes. Após a seleção, os animais foram submetidos a uma adaptação ao exercício em esteira rolante, com

velocidades (5 à 20m/min) e durações (5 à 15min) progressivas. O objetivo da adaptação também foi a redução dos níveis de estresses apresentados pelo animal sem promoção do treinamento físico.

Determinação da máxima fase estável de lactato

Todo o protocolo experimental foi realizado em condições ambientais idênticas às ocorridas durante o período de adaptação, tanto na natação quanto na esteira rolante.

Em ambos os exercícios, o protocolo para a determinação da MFEL foi composto por cinco testes contínuos com duração de 25 minutos, em diferentes intensidades de esforço, distribuídas aleatoriamente e separadas por um intervalo de 48 horas de descanso. Em todos os testes houve coleta de sangue da cauda dos animais nos tempos repouso, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos de exercício, para posterior análise do lactato sanguíneo e obtenção das curvas lactacidêmicas em cada intensidade.

Testes na natação

Os ratos realizaram 25 minutos de esforços contínuos em cargas equivalentes a 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0% do peso corporal, atadas ao dorso. O ajuste das cargas ocorreu diariamente, com mensuração da massa corporal dos animais. Para cada intensidade foram efetuadas extrações de sangue da cauda dos animais nos tempos já descritos e o tratamento da amostra sanguínea ocorreu conforme técnica posteriormente detalhada.

Testes de corrida em esteira rolante

Para a avaliação da MFEL em corrida, os animais selecionados executaram os testes contínuos nas velocidades de 15, 20, 25 e 30m/min. A esteira rolante específica para o

treinamento de ratos, composta por oito baias, foi mantida com o dispositivo de choque elétrico desligado, reduzindo o efeito do estresse na realização do esforço pelo animal. Do mesmo modo que na natação, amostras sanguíneas foram retiradas da cauda dos ratos.

Amostras sanguíneas e análise

Durante os testes contínuos, amostras sanguíneas (25µl) foram extraídas da cauda do animal nos tempos já descritos e depositadas em tubos *Eppendorf* (capacidade de 1,5 ml), contendo 50µl de fluoreto de sódio (1%). Para evitar a diluição do sangue na água no caso dos nadadores, os animais foram retirados do cilindro e secos, retornando ao meio líquido imediatamente após a coleta sanguínea. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas em um analisador de lactato (Modelo YSI 1500 Sport, Yellow Springs, OH, EUA).

Análise Estatística

Em ambos os ergômetros, a MFEL foi interpretada como a mais alta intensidade de exercício na qual o aumento da lactacidemia foi igual ou inferior à 1mmol/L, do 10º ao 25º minuto. As concentrações médias de lactato sanguíneo em cada intensidade para os dois ergômetros foram obtidas através da média dos valores lactacidêmicos dos tempos 10, 15, 20 e 25 minutos de exercício. Uma Anova one-way foi utilizada para identificar as diferenças entre as concentrações de lactato sanguíneo nas diversas durações do exercício contínuo e entre ergômetros distintos: natação e esteira rolante. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média. Em todos os procedimentos estatísticos, o nível de significância foi prefixado em $P < 0,05$ (Dawson-Saunders e Trapp, 1994).

RESULTADOS

Na figura 2.1 estão expressas as curvas de lactato sanguíneo dos ratos submetidos ao exercício de natação. A MFEL foi observada na intensidade equivalente a 5% do peso corporal, em concentração média de lactato $5,20 \pm 0,22$ mmol/L.

No exercício de corrida, a velocidade correspondente à máxima fase estável de lactato foi 20m/min, porém em concentração de lactato $3,87 \pm 0,33$ mmol/L (figura 2.1). Na intensidade equivalente a 30m/min apenas 20% dos animais completaram o teste.

A Anova one-way identificou diferença significativa entre a máxima fase estável de lactato obtida em exercício natação e esteira rolante.

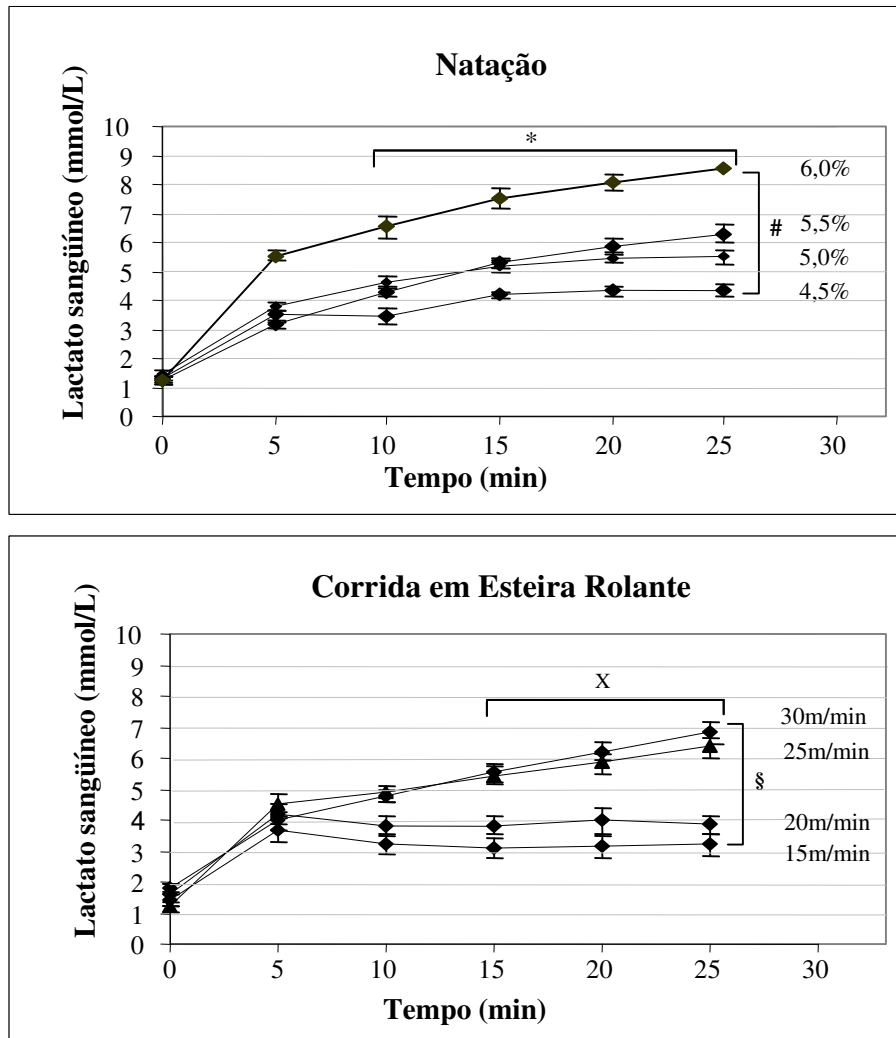


Figura 2.1. Máxima fase estável de lactato sanguíneo obtida em exercício de natação para ratos (a) (n=20) e corrida em esteira rolante (n=20) (b). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. A lactacidemia durante o exercício foi superior à inicial em todos os casos. *diferença significativa entre a lactacidemia aos 5 minutos e os demais valores de lactato sanguíneo em todas as intensidades de exercício. # diferença significativa entre os valores de lactato sanguíneo na intensidade de 6% das demais intensidades, do décimo ao vigésimo quinto minuto de exercício. § diferença significativa entre a lactacidemia do décimo quinto ao vigésimo quinto minuto e os valores de lactato aos 5 minutos, nas velocidades equivalentes a 25 e 30m/min. x diferença significativa entre as curvas lactacidêmicas nas velocidades 25 e 30m/min comparadas às curvas de lactato obtidas à 15 e 20m/min, do décimo quinto ao vigésimo quinto minuto de exercício.

DISCUSSÃO

Apesar da produção de lactato ocorrer internamente no músculo esquelético, as mensurações sanguíneas desse metabólito durante o exercício fornecem informações precisas acerca do fornecimento energético para execução do esforço, implicando na utilização desse parâmetro como uma ferramenta na prescrição (Mujika et al., 1995) e acompanhamento do treinamento esportivo (Pyne et al., 2001).

A máxima fase estável de lactato está relacionada ao equilíbrio bioquímico de aparecimento e remoção do lactato sanguíneo (Mader e Heck, 1986) e é considerada a mais alta intensidade de exercício na qual esse estado estável ainda ocorre, delimitando assim uma transição de predominância metabólica aeróbia-anaeróbia (Beneke, 1995; Billat et al., 2003). Dessa forma é considerado um método seguro para identificação da capacidade aeróbia (Jones e Carter, 2000), o que corrobora para que muitos estudos utilizem esse procedimento na avaliação de indivíduos ativos e atletas de alto rendimento (Jones e Doust, 1998; Harnish et al., 2001; Beneke, 2003).

A importância de nosso estudo encontra-se na aplicação desse protocolo individual para avaliação de animais laboratoriais em dois diferentes tipos de exercício: natação e esteira rolante. Além disso, há grande significado científico em obter informações acerca de prováveis diferenças da resposta lactacidêmica em dois ergômetros muito utilizados para treinamento de ratos Wistar.

Em natação, nossos resultados de MFEL assemelham-se aos apontados por Gobatto et al. (2001) e Voltarelli et al. (2002). A estabilização do lactato sanguíneo para nossos ratos sedentários foi obtida em 5% do peso corporal, assim como descrito por Voltarelli et al. (2002). Gobatto et al. (2001) relataram carga de estabilização igual a 6% do pc. Essa pequena distinção

na carga relativa à MFEL pode estar relacionada com a especificidade da piscina utilizada. No presente trabalho, optamos por realizar o exercício de natação em tanque profundo (60cm de diâmetro por 120cm de profundidade) e com superfície lisa, evitando assim que os animais se apoiassem nas laterais da piscina durante a execução do teste ou atingissem o fundo do tanque executando movimento de salto. No estudo de Gobatto et al. (2001), as piscinas utilizadas não eram profundas (100 cm de diâmetro por 80 cm de profundidade), o que possivelmente favoreceu a atividade dos ratos.

A concentração de estabilização do lactato na máxima intensidade aeróbia em natação foi $5,20 \pm 0,22$ mmol/L, valor muito próximo ao descrito por Gobatto et al. (2001) para ratos sedentários (5,5 mmol/L), o que sugere reprodutibilidade dessa concentração para a espécie de animais avaliados. Mesmo após treinamento aeróbio, Gobatto et al. (2001) não observaram alteração na concentração de estabilização de lactato. Em humanos, a estabilização do lactato em máxima intensidade aeróbia encontra-se, em média, entre 3 e 7 mmol/L (Stegmann et al., 1981; Harnish et al., 2000), porém, em exercício de natação, esse valor parece estar próximo do limite inferior da faixa descrita. Pereira et al. (2002) determinaram o limiar anaeróbio de atletas nadadores em teste progressivo e observaram inflexão da curva lactacidêmica em concentração 3,5 mmol/L. Dessa forma, parece que ratos Wistar apresentam valores superiores de concentração de lactato na MFEL em exercício de natação, quando comparados à humanos.

Na corrida em esteira rolante obtivemos MFEL em intensidade 20m/min, em concentração $3,87 \pm 0,33$ mmol/L. Pilis et al. (1993) e Langfort et al. (1996) sugerem a ocorrência do limiar anaeróbio em ratos corredores na velocidade 25m/min, superior aos nossos achados. No presente estudo, os animais foram submetidos a 25 minutos de exercício contínuo nas velocidades 15, 20, 25 e 30 m/min, permitindo um maior acompanhamento da cinética do lactato

sangüíneo, ao passo que aqueles autores apenas observaram o comportamento do lactato frente a exercício progressivo.

Quanto à concentração de lactato, o exercício em esteira rolante promoveu estabilização em valor significativamente inferior ao observado em natação (figura 2.1). A concentração lactacidêmica verificada no presente estudo é semelhante ao ponto de inflexão da curva de lactato descrito por Pilis et al.(1993) (4mmol/L) e ao valor obtido em estudo clássico realizado com humanos nesse tipo de exercício (Heck et al., 1985). Não existem, na literatura, trabalhos que apresentem resultados de treinamento aeróbio de corrida em máxima fase estável de lactato com ratos Wistar, assim como o realizado por Gobatto et al. (2001) em natação.

A distinção entre as concentrações lactacidêmicas em MFEL apresentadas em natação e corrida em esteira rolante necessita de maiores investigações. Entretanto, é possível especularmos que fatores como a posição ortostática dos ratos em meio líquido, o estresse promovido pela imersão na água e a quantidade de músculos envolvidos trabalhando ininterruptamente durante o exercício de natação possam estar relacionados à maior concentração de estabilização do lactato verificada nesse ergômetro.

Nossos resultados demonstram claramente a ergômetro-dependência do protocolo de máxima fase estável de lactato em exercícios para ratos Wistar, assim como o que ocorre com humanos. Isso sugere a necessidade de cautela na avaliação e prescrição de treinamento físico para esses animais. Mais estudos devem ser realizados com ratos em diferentes condições fisiopatológicas e de treinamento para identificação de possíveis alterações no parâmetro aeróbio avaliado.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi suportado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 07070-5/2004) e contou também com o apoio dos órgãos de fomento CAPES e CNPq (Proc. 300270/2004-16). Agradecemos ao apoio técnico de José Roberto Rodrigues da Silva, Eduardo Custódio e à Clarice Yoshiko Sibuya.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc**, v.27(6), p.863-7, 1995.
2. BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v.89, p.95-9, 2003.
3. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v.33(6), p.407-26, 2003.
4. BRAGA, L.R.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.54, p.58-65, 2004.
5. CHASSAIN, A. Méthode d’appréciation objective de la tolérance de l’organisme á l’effort: application á la mesure des puissances de la fréquence cardiaque et de la lactatémie. **Science & Sports**, v.1, p.41-8, 1986.

6. DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP R G. **Basic and clinical biostatistic**. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.
7. GAESSER, G.A.; POOLE, D.C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exerc Sports Sci Rev**, v. 24, p.35-70, 1996.
8. GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C. Y.; MELLO, M. A. R. 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, p.725-6, 1991.
9. 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. **Comp Biochem Physiol**, v.130A, p.21-7, 2001.
10. HARNISH, C.R.; SWENSEN, T.C.; PATE, R.P. Methods for estimating the maximal lactate steady state in trained cyclists. **Med Sci Sports Exerc**, v.33, p.1052-5, 2001.
11. HARRI, M.; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold expose for rats? **Acta Physiol Scand**, v.126, p.189-97, 1986.
12. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. **Int J Sports Med**, v.6, p.117-30, 1985.
13. JONES, A.M.; DOUSTY, J.H. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8Km running performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, p.1304-13, 1998.

14. JONES, A.M.; CARTER; H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Med**, v. 29, p. 373-6, 2000.
15. KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol**, v.42, p.25-34, 1979.
16. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.114 A, p.51-5, 1996.
17. MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int J Sports Med**, v.7, p.45-65, 1986.
18. MARANGON, L.;GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R; KOKUBUN, E. Utilization of an hiperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc (Suppl)**, v. 34, p.149. 2002.
19. MONOD, H.; SCHERER J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics** v.8, p.329-38, 1965.
20. MUJIKA, I.; CHATARD, J.C.; BUSSO, T.; GEYSSANT, A.; BARALE, F.; LACOSTE, L. Effects of training on performance in competitive swimming. **Can J Appl Physiol**, v. 20, p.395-406, 1995.
21. MURDES, J.P.; BORTEL, R.; BLANKNHIN, E.P.; ROSSIN, A.A.; GARNIER, D.L. Rats models of type 1 diabetes: genetics, environment and autoimmunity. **Iiac J**, v. 45, p. 278-91, 2004.

22. OLIVEIRA, C.A.M.; LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. The role of exercise on long term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Exp Physiology**, v.90, p.79-86, 2005.
23. PEREIRA, R.R.; ZAGATTO, A.M.; PAPOTI, M.; GOBATTO, C.A. Validação de dois protocolos de teste para determinação do limiar anaeróbio em natação. **Motriz**, v.8, p.63-8, 2002.
24. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106A, p.285-9. 1993.
25. PYNE, B.; LEE, H.; SWANWICK, K.M. Monitoring the lactate threshold in world ranked swimmers. **Med Sci Sports Exerc**, v.33, p.291-7, 2001.
26. SJÖDIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int J Sports Med**, v.2, p.23-6, 1981
27. STEGMANN, H.; KINDERMANN, W.; SCHANABEL, A. Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. **Int J Sports Exerc**, v.2; p.160-5, 1981.
28. TEGTBUR, U.; BUSSE, M.W.; BRAUMANN, K. M.. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v.25, p.620-7, 1993.
29. VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.

30. WASSERMAN, K.; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am J Cardiol**, V.14; P. 844-852, 1964.

ESTUDO 3

PROTOCOLO NÃO EXAUSTIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE AERÓBIA EM NATAÇÃO DE RATOS

NON-EXHAUSTIVE TEST FOR AEROBIC CAPACITY DETERMINATION IN SWIMMING RATS

Fúlvia de Barros Manchado^{1,2}, Claudio Alexandre Gobatto¹, Fabrício Azevedo Voltarelli¹, Maria
Alice Rostom de Mello¹

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Educação Física, Rio Claro – São
Paulo – Brasil

2- Faculdades Integradas Einstein de Limeira- Fiel – Limeira – Brasil

Manchado et al., Applied Physiology Nutrition and Metabolism, 31: 731-736, 2006

RESUMO

Por diversas razões, um grande número de estudos envolvendo exercício vem sendo desenvolvido em animais laboratoriais, especialmente em ratos. Desta forma, a padronização de métodos para a avaliação física de ratos exercitados é necessária. O objetivo do presente estudo foi descrever um método não exaustivo de duplos esforços de exercício para a avaliação da capacidade aeróbia em natação de ratos, inicialmente sugerido para avaliação aeróbia de humanos. Ratos machos adultos realizaram quatro testes em diferentes intensidades (4%, 6%, 7% e 8% do peso corporal), com intervalos de 48 horas entre eles. Os ratos realizaram dois esforços de cinco minutos em cada intensidade, separados por dois minutos de repouso entre eles, com coleta de sangue para análise do lactato sangüíneo ao final do primeiro e segundo esforço. Para cada intensidade foi calculado valor de delta lactato subtraindo a concentração ao final do primeiro esforço da lactacidemia ao final do segundo esforço. Uma interpolação linear individual foi plotada com os valores de delta lactato obtido em cada carga, permitindo a determinação do delta lactato nulo, equivalente à carga crítica (Ccrit). Posteriormente a máxima fase estável (MFEL) foi obtida em três testes contínuos com duração de 25 minutos. A Ccrit estimada foi $4,80 \pm 0,20\%$ pc, com regressões lineares significantes ($R=0,90 \pm 0,03$). A MFEL foi observada à 100% de Ccrit, em concentração de lactato sangüíneo $5,20 \pm 0,10$ mmol/L. A 90% Ccrit, houve estabilização da lactacidemia, porém em concentração menor ($4,20 \pm 0,20$ mmol/L). Houve um aumento progressivo na concentração de lactato sangüíneo na intensidade equivalente a 110% da Ccrit. Esses resultados oferecem um potencial para aplicação do teste de natação não exaustivo para a determinação da capacidade aeróbia de ratos.

Palavras-chave: método não exaustivo, lactato sangüíneo, carga crítica, máxima fase estável de lactato.

ABSTRACT

For obvious reasons, a large number of studies involving exercise is conducted in laboratory animals, mainly rats. Therefore, it is necessary to develop methods for physical evaluation of exercised rats. The aim of the study was to describe a double bouts exercise test for non-exhaustive aerobic capacity determination in swimming rats. Adult male rats accomplished four swimming tests at different intensities (4%, 6%, 7% and 8% of body weight), with intervals of 48 hours among them. The rats swam two efforts of 5 minutes each at the same intensity, separated by a 2 minutes rest, with blood collection for lactate analysis. For each intensity, it was calculated the value of delta lactate by subtracting the concentration at the end of the first effort from the lactate concentration at the end of the second effort. With the delta lactate obtained for each load, an individual linear interpolation was plotted, which enabled the determination of a “null” delta lactate, equivalent to the critical load (CL). We also checked the maximal lactate steady state (MLSS). The estimated CL was of $4.80 \pm 0.20\%$ bw, with significant linear regressions ($R=0.90 \pm 0.03$). The MLSS was observed at 100% of CL, with blood lactate of 5.20 ± 0.10 mmol/L. At 90%CL, there was also stabilization of blood lactate, but in lower concentration (4.20 ± 0.20 mmol/L). There was a progressive increase in blood lactate concentration at 110% of CL. These results offer a potential application of the test to swimming rats for the determination of the aerobic/anaerobic metabolism transition.

Key-words: non-exhaustive test, blood lactate, critical load, maximal lactate steady state

INTRODUÇÃO

O fornecimento de adenosina trifosfato para a manutenção do exercício pode ser proveniente dos metabolismos aeróbio ou anaeróbio (Brooks, 2000). Em exercício moderado, as respostas fisiológicas apresentam rápida estabilização e a presença de oxigênio supre de forma satisfatória a demanda energética imposta (Gaesser e Poole, 1996). Em intensidades demasiadamente superiores, a via metabólica predominante é anaeróbia, o que resulta na redução abrupta do pH muscular em consequência do aumento da produção de lactato, dificultando a realização do exercício por tempo prolongado.

Existe uma zona de transição a partir da qual há mudança de predominância do metabolismo aeróbio para o anaeróbio, sendo essa zona de exercício extremamente importante para o condicionamento físico, treinamento e rendimento desportivo. Por esse motivo, diversas investigações acerca dessa intensidade vêm sendo realizadas nas últimas décadas, culminando em distintos protocolos de avaliação fisiológica. Dentre os mais utilizados podemos citar o limiar ventilatório observado por Wasserman e McIlroy, em 1964; a utilização de concentração de lactato sangüíneo para identificar o limiar anaeróbio (LAn), proposto por Kinderman et al. (1979); o limiar anaeróbio obtido pela concentração fixa de 4,0 mmol/L (OBLA) inicialmente sugerido por Sjödín e Jacobs (1981); o protocolo de limiar anaeróbio individual apresentado por Tegtbur et al. (1993) e o modelo de potência crítica não invasivo e exaustivo proposto por Monod e Scherrer, em 1965, dentre outros. Grande parte desses protocolos de avaliação utiliza a resposta das concentrações de lactato sangüíneo devido à fidedignidade e reprodutibilidade desse parâmetro bioquímico na mensuração da intensidade de transição entre as predominâncias metabólicas aeróbia e anaeróbia de fornecimento de energia durante o esforço (Beneke, 2003).

Além disso, a lactacidemia apresenta uma excelente resposta ao treinamento físico, permitindo além da caracterização do esforço, um acompanhamento da eficiência do treinamento crônico.

Em 1986, Chassain desenvolveu uma metodologia baseada na frequência cardíaca (FC), consumo de oxigênio e lactacidemia. O pressuposto inicial seguido pelos autores foi a existência de uma intensidade alta na qual há estabilização das variáveis fisiológicas. Portanto, o método conhecido como Chassain consiste em submeter o indivíduo a esforços “duplos”, ou seja, duas sessões de exercício de mesma intensidade, com duração de três minutos cada uma, intercaladas por um intervalo de recuperação passiva de 1,5 minutos (Chassain, 1986).

Durante a realização de cada série é registrada a FC, sendo tomado como referencial o valor mais alto, o que permite analisar a variação de FC entre o primeiro (E1) e o segundo (E2) exercício utilizando a equação: $\Delta FC = FC_{E2} - FC_{E1}$. O mesmo é realizado com a lactacidemia e respostas do consumo de oxigênio. Com os resultados obtidos, plota-se um gráfico e por interpolação linear obtém-se o valor da intensidade em que o ΔFC , ΔLAC e ΔVO_2 são nulos. Ao menos teoricamente, essa intensidade corresponde à máxima fase estável das variáveis fisiológicas. Esse ponto é entendido como a potência crítica (Chassain, 1986).

Muitos estudos têm testado a validade de tais protocolos em seres humanos, comparando os valores encontrados à máxima fase estável de lactato (MFEL), intensidade na qual a capacidade de remoção desse metabólito permite compensar sua produção e que efetivamente é o último momento em que o metabolismo aeróbio ainda é predominante.

A fisiologia do exercício tem usado, ao longo dos anos, recursos de modelos animais, especialmente para a prática de manipulações muito invasivas, efetuando análises aos níveis celular e molecular. A utilização de mamíferos em pesquisas laboratoriais procura simular condições de estresse físico observado em seres humanos, visando o acompanhamento mais

apropriado das alterações sistêmicas decorrentes do exercício. Dentre os mais usados “ergômetros” para animais estão a esteira rolante e a natação, e os mamíferos mais avaliados são, sem dúvida, os ratos, por serem pequenos, de fácil manipulação e de boa resposta ao exercício.

Um número significativo de pesquisas envolvendo exercício tem sido realizado com animais e o lactato sangüíneo usado em muitas delas para a determinação da intensidade do esforço. Entretanto, tal procedimento é dificultado pela carência de informações referentes à cinética do lactato em ratos, especialmente em exercícios de natação. Nosso grupo de pesquisa vem, há aproximadamente uma década, testando esses modelos de avaliação e o comportamento do lactato em exercício. Inicialmente, foi padronizado um teste com cargas progressivas na tentativa de verificar as respostas funcionais dos ratos à mobilização de substratos energéticos em situação de estresse físico agudo, progressivamente mais intenso (Gobatto et al., 1991). Após muita investigação, foi determinado o valor da máxima fase estável de lactato obtida com ratos Wistar por protocolos de exercício com cargas contínuas foi de 5,5 mmol/L e tal concentração comprovada quando os animais foram submetidos ao treinamento (Gobatto et al., 2001). Recentemente, Voltarelli et al. (2002) determinaram o limiar anaeróbio individual a partir do protocolo de Tegtbur et al. (1993), encontrando padrões de lactacidemia semelhantes à de humanos. Marangon et al. (2002), em estudo pioneiro, testou a determinação da intensidade de carga crítica em ratos do um modelo não invasivo, protocolo que novamente avaliado por Gobatto et al. (2005) em animais com distintas condições alimentares.

Existe um grande interesse em estimar a intensidade de esforço suportada por ratos durante o exercício devido a ampla utilização desses animais em diversas áreas de pesquisa. Adaptações ao exercício crônico resultam em respostas coordenadas de múltiplos sistemas, incluindo o pulmonar, cardiovascular, endócrino-metabólico e muscular esquelético. Com a

geração de modelos de experimentais simulando, com ratos, síndromes metabólicas desenvolvidas por humanos (Scalfani, 1984; Murders et al, 2004), o desenvolvimento de testes para avaliação do esforço desses animais durante o exercício representa, como uma consequência, uma precisa avaliação das respostas fisiológicas desses animais. Além disso, testes simples que não necessitem de procedimento exaustivo podem colaborar com tais avaliações.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi padronizar um protocolo invasivo e não exaustivo, inicialmente sugerido por Chassain (1986) como avaliação aeróbia em seres humanos, para a determinação da carga crítica de ratos, efetuando a validação da metodologia através da máxima fase estável de lactato sanguíneo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com a política do Colégio Americano de Medicina do Esporte. Quinze ratos da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, pesando 320-400g no início do experimento e 420-500g no final, foram utilizados. Durante todo o período experimental, os animais foram alojados em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) em uma sala iluminada das 6:00 às 18:00 horas à temperatura de aproximadamente 25°C, recebendo ração comercial própria para roedores (Labina-Purina) e água *ad libitum*.

Adaptação ao meio líquido

Anteriormente à realização de todo o protocolo, os ratos foram adaptados ao meio líquido de forma padronizada e progressiva. A adaptação ocorreu no período total de 15 dias

ininterruptos, em um tanque cilíndrico com superfície lisa medindo 60 cm de diâmetro por 120 cm de profundidade (Marangon et al., 2002), com a temperatura da água mantida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Harri e Kuusela, 1986). O tanque profundo foi utilizado para que os animais não atingissem seu fundo e, conseqüentemente realizassem exercício de natação durante a adaptação da forma mais próxima à executada durante todos os testes subseqüentes. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal sem, entretanto, promover adaptações fisiológicas decorrentes do treinamento físico.

Inicialmente os ratos foram inseridos em água rasa por três dias durante quinze minutos. Posteriormente, o nível da água foi aumentado, bem como o tempo de duração do esforço e a carga a ser sustentada pelo animal. Assim, no quarto dia, os ratos nadaram em água profunda por dois minutos, com acréscimo de dois minutos a cada dia até o décimo dia de adaptação. No décimo primeiro dia, os animais foram submetidos ao exercício de natação por 5 minutos suportando uma carga de 3% de seu peso corporal, com acréscimos de 5 minutos a cada dia, quando, no décimo quinto dia, foi encerrada a adaptação.

Protocolo Experimental

Os animais foram submetidos a quatro testes de natação em intensidades distintas, suportando carga equivalente a 4, 6, 7 e 8% do peso corporal atadas ao dorso, realizadas em intervalos de 48 horas e distribuídas aleatoriamente. Cabe ressaltar que a escolha dessas intensidades foi baseada em protocolo piloto, a partir do qual essas cargas foram destacadas como as mais adequadas para o fornecimento de interpolações lineares dos resultados. A característica desse protocolo é a realização de duplos esforços de mesma intensidade, com um período de recuperação entre eles. Para humanos, o protocolo consiste de dois esforços de 3 minutos separados por um intervalo de 1,5 minuto. No presente estudo, os duplos esforços apresentaram a duração de 5 minutos, com intervalo passivo de 2 minutos entre eles. Como ilustrado na figura abaixo, foram coletadas amostras sanguíneas da cauda dos animais ao final de cada esforço (Figura 3.1).

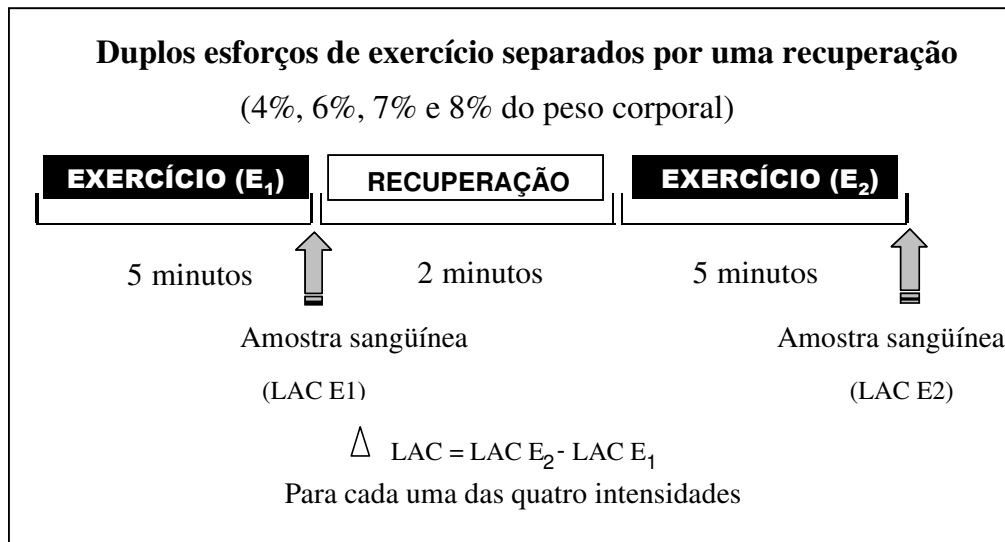


Figura 3.1. Protocolo experimental utilizado no presente estudo, baseado no Método Chassain (1986), inicialmente sugerido para a avaliação da capacidade aeróbia de humanos.

Para cada uma das quatro intensidades foi obtido o valor de delta lactato, subtraindo a lactacidemia ao final do primeiro esforço (LAC_{E1}) da concentração de lactato ao final do segundo esforço (LAC_{E2}). Com os deltas lactato para cada carga, foi realizada interpolação linear individual, a qual forneceu o valor de delta lactato zero, equivalente à carga crítica (Ccrit) calculada pelo método Chassain (1986) (Figura 3.2).

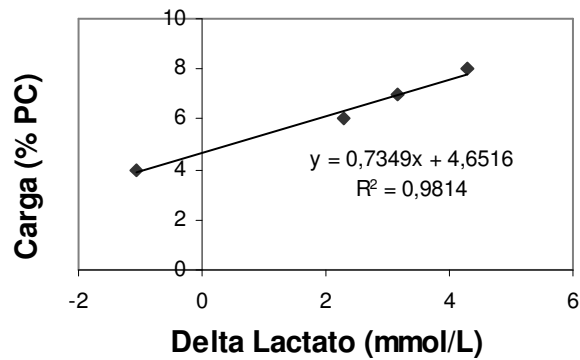


Figura 3.2. Exemplo da determinação da carga crítica (Ccrit) de um único rato utilizando o procedimento não exaustivo de duplos esforços. Cada ponto expresso graficamente representa o delta lactato obtido em intensidade equivalente. A Ccrit estimada corresponde ao intercepto y da regressão linear obtida.

Para verificar a possível estabilização do lactato sangüíneo na intensidade de Ccrit, os ratos foram submetidos a 25 minutos de exercício contínuo nas cargas equivalentes a 90%, 100% e 110% de Ccrit, com amostras sangüíneas coletadas a cada 5 minutos. Considerou-se máxima fase estável de lactato a mais alta intensidade na qual o aumento da lactacidemia foi igual ou inferior à 1mmol/L, do 10° ao 25° minuto de exercício.

Amostras sangüíneas e análise

Durante os testes, amostras sangüíneas (25µl) foram extraídas da cauda do animal nos tempos já descritos e depositadas em tubos *Eppendorf* (capacidade de 1,5 ml), contendo 50µl de fluoreto de sódio (1%). Para evitar a diluição do sangue na água, os animais foram retirados do cilindro e secos, retornando ao meio líquido imediatamente após a coleta sangüínea. As concentrações de lactato sangüíneo foram determinadas em um analisador de lactato (Modelo YSI 1500 Sport, Yellow Springs, OH, EUA).

Análise Estatística

O procedimento estatístico utilizado foi a ANOVA one-way. Quando necessário, o teste de post-hoc Newman-Keuls foi adotado (Dawson-Saunders e Trapp, 1994). Em todos os casos, o nível de significância foi pré-estabelecido em $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores de delta lactato sangüíneo apresentaram aumento linear de acordo com a intensidade de exercício, sendo maiores em cargas elevadas. A carga crítica estimada foi $4,79 \pm 0,19\%$ do peso corporal dos animais, com regressões lineares individuais significativas (Tabela 3.1).

A máxima fase estável de lactato foi obtida à concentração de $5,20 \pm 0,10\text{mmol/L}$ de sangue em intensidade equivalente a 100% da carga crítica dos animais. A 90% de Ccrit, a estabilização do lactato sangüíneo foi observada, porém em concentração inferior ($4,20 \pm 0,20\text{mmol/L}$). Houve um aumento progressivo na lactacidemia quando os ratos foram submetidos à natação suportando intensidade equivalente a 110% da Ccrit e, alguns animais, apresentaram exaustão entre o 10^o e o 25^o minuto de exercício (Figura 3.3).

Tabela 3.1. Valores individuais de delta lactato para cada intensidade (4, 6, 7 e 8% do peso corporal), carga crítica estimada pelo método dos duplos esforços (Ccrit) e valores de coeficiente de regressão linear (R).

Rato	carga	DELTA LACTATO				Ccrit (%pc)	R
		4%	6%	7%	8%		
1		-1,05	0,80	2,25	1,85	4,69	0,92
2		-0,15	-0,06	0,63	2,88	5,44	0,81
3		-1,68	0,31	2,10	3,12	5,47	0,99
4		-0,72	2,22	2,55	3,61	4,52	0,98
5		-1,05	2,29	3,16	4,30	4,65	0,99
6		-0,44	-0,33	1,80	2,01	5,39	0,87
7		-0,03	1,32	1,97	2,73	3,39	0,99
8		-0,22	1,56	2,19	1,69	4,40	0,87
9		-0,92	3,12	0,45	2,61	5,49	0,64
10		0,89	2,81	4,17	4,30	3,04	0,98
11		-1,05	0,59	1,29	2,47	5,30	0,99
12		-0,79	0,94	2,10	2,39	4,89	0,99
13		-1,09	1,93	6,48	2,49	5,30	0,70
14		-0,41	0,17	0,57	1,03	5,31	0,99
15		-0,87	3,41	3,51	3,61	4,56	0,89
Media		-0,59	1,69	2,34	2,74	4,79	0,91
E.P.M		0,15	0,26	0,40	0,24	0,19	0,03

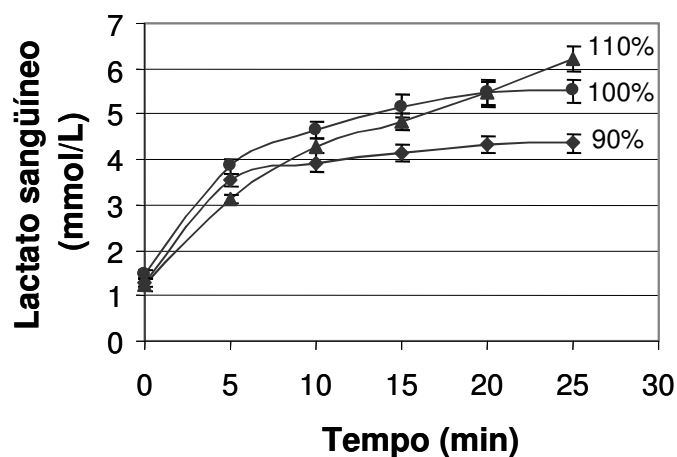


Figura 3.3. Concentração de lactato sanguíneo durante testes de exercício contínuo com os ratos suportando cargas correspondentes a 90, 100 e 110% da Ccrit (n=15). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

DISCUSSÃO

Uma evolução em pesquisas objetivando determinar a intensidade de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio tem sido observada nas últimas décadas, resultando em distintos protocolos com metodologias variadas, complexas ou simplificadas, destinados à avaliação de seres humanos (Monod e Scherrer, 1965; Mader e Heck, 1976; Kinderman et al., 1979; Sjödín e Jacobs, 1981; Chassain, 1986; Sid-Ali et al., 1991; Tegtbur et al., 1993; Hill et al., 1993; Beneke, 1995; Beneke, 2003). Modelos de exercício para animais são muito utilizados, especialmente para manipulações intrínsecas e controle de patologias, porém são raros os estudos que destinam-se à avaliação e quantificação da intensidade de exercício aplicada à cobaias (Gobatto et al., 1991; Pilis et al., 1993; Langfort et al., 1996; Gobatto et al., 2001; Voltarelli et al., 2002; Marangon et al., 2002; Gobatto et al., 2005; Billat et al., 2005).

Nosso estudo mostrou que a adaptação de um protocolo inicialmente sugerido para humanos pode representar uma forma de avaliação da intensidade de esforço em natação de ratos. Como é possível observar na tabela 3.1, a grande maioria dos animais apresentou deltas lactato satisfatórios e lineares, aumentando de forma progressiva com o a elevação da intensidade dos duplos esforços. Chassain (1986) reportou resultados similares com protocolo originalmente desenvolvido em cicloergômetro com indivíduos jovens, acrescentando ainda que esse comportamento dos deltas ocorre também com as respostas de FC e VO_2 . Em 1991, Sid-Ali et al. estimaram a potência crítica em cicloergômetro de acordo com o método Chassain e também obtiveram aumentos lineares de deltas lactato.

A maior distinção do protocolo aqui proposto em relação ao sugerido por Chassain (1986) encontra-se na duração dos duplos esforços e recuperação entre eles. Em seu estudo, Chassain (1986) utilizou dois esforços de três minutos intercalados por um minuto e meio de recuperação passiva. Em humanos, esse tipo de pausa já promove, em intensidades sublimiares,

o início da recuperação lactacidêmica (Oyono-Enguelle et al., 1990). Devido ao lactato sangüíneo, em ratos, apresentar uma resposta menos veloz ao exercício em comparação à observada em humanos, esforços moderados de três minutos muitas vezes não são suficientes para elevar a lactacidemia. Estudos envolvendo avaliações fisiológicas em natação com esse tipo de cobaia têm optado por realizar estágios de cinco minutos de exercício, e não três, para promover alterações e estabilizações significativas nessa variável. (Gobatto et al., 1991; Voltarelli et al, 2002; Prada et al., 2004). Desta forma, utilizamos duplos esforços com duração de cinco minutos separados por recuperação passiva de dois minutos, resultando em uma relação esforço-pausa similar à descrita por Chassain (1986).

Uma característica comum às metodologias indicadas para a avaliação aeróbia em ratos, tanto em natação como em esteira rolante, é a necessidade da exaustão (Gobatto et al, 1991; Pilis et al., 1993; Langfort et al, 1996; Voltarelli et al., 2002; Marangon et al., 2002; Prada et al., 2004; Gobatto et al., 2005; Billat et al., 2005). Esse é um fator que limita a aplicação dos testes, já que situações exaustivas estão associadas à respostas fisiológicas máximas (Brickley et al., 2002), o que não é recomendado à animais portadores de patologias ou controle de treinamento periodizado. Como é possível observar na tabela 1, em nosso estudo houve a possibilidade de determinação individual da carga crítica utilizando um procedimento não exaustivo.

Outra vantagem do teste de duplos esforços proposto é a independência da cinética do lactato sangüíneo. Apesar de Pilis et al. (1993) e Langfort et al. (1996) determinarem o limiar anaeróbio de ratos utilizando teste de velocidades progressivas em esteira rolante, Gobatto et al. (1991) não constataram um padrão esperado da cinética de lactato sangüíneo em protocolo de incrementos de carga em natação.

A carga crítica encontrada em nosso estudo foi igual a $4,79 \pm 0,19\%$ do peso corporal dos animais. Por representar a mais alta intensidade de exercício na qual a capacidade de remoção do lactato permite compensar sua remoção (Mader e Heck, 1986; Pringle e Jones, 2002; Billat et al., 2003) e ser considerado o método “padrão ouro” de determinação da transição de metabolismos aeróbio/anaeróbio (Beneke et al., 1995; Billat, 2003, Beneke et al, 2003), utilizamos a máxima fase estável de lactato em exercícios contínuos para validar nosso protocolo.

A máxima fase estável de lactato foi obtida em intensidade correspondente a 100% de Ccrit, com os animais suportando aproximadamente 5% de seu peso corporal e observada em concentração $5,20 \pm 0,10\text{mmol/L}$ (Figura 3). Deste modo, a maior contribuição do nosso estudo refere-se a Ccrit determinada pelo método não exaustivo representar, efetivamente, a intensidade de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio em exercício de natação de ratos sedentários.

Resultados similares, tanto de intensidade de exercício associada à MFEL quanto da concentração de estabilização de lactato, são encontrados em outras referências. Gobatto et al. (2001) submeteram 27 ratos Wistar sedentários a seis testes contínuos de natação em cargas equivalentes a 5, 6, 7, 8, 9 e 10% do seu peso corporal. A MFEL foi obtida em concentração $5,5\text{mmol/L}$, em carga equivalente à 5%. Após o treinamento físico, os animais elevaram a de MFEL para 8%, porém a concentração de lactato nessa intensidade permaneceu inalterada ($5,5\text{mmol/L}$). Voltarelli et al. (2002), também utilizando a natação de ratos, observaram MFEL em carga $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal, porém em concentração $7,17 \pm 0,16\text{mmol/L}$. Na esteira rolante, a concentração de lactato sanguíneo em intensidade de limiar aneróbio parece ser menor, por volta de 4mmol/L (Pilis et al., 1993; Langfort et al., 1996), concentração semelhante à descrita por pesquisas envolvendo seres humanos (Heck et al., 1985). Essas variações entre

concentração de estabilização e intensidade na qual ela ocorre, sugerem a protocolo-dependência das respostas do lactato sangüíneo, assim como é reportado para indivíduos (Jones e Doust, 1998; Schneider et al., 2000).

Mais investigações e estudos de padronização e otimização de protocolos de avaliação fisiológica em animais laboratoriais são necessários. A tendência da utilização de modelos experimentais é simular situações observadas em humanos e, portanto, treinamentos físicos periodizados e bem acompanhados futuramente serão aplicados a animais.

Nossos resultados indicam que o protocolo não exaustivo de duplos esforços adaptado à natação de ratos é simples, aplicável e adequado para determinar a intensidade de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio, avaliando com precisão a condição aeróbia de ratos jovens sedentários. Para a elaboração, planejamento e controle do treinamento físico, essa detecção é fundamental.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi financiado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 07070-5/2004), sendo também apoiado pelos órgãos de fomento CAPES e CNPq (Proc. 300270/2004-16). Agradecemos o auxílio técnico de José Roberto Rodrigues da Silva, Eduardo Custódio e Clarice Yoshiko Sibuya.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc**, v.27(6), p.863-867, 1995.

2. BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v.89, p.95-9, 2003.
3. BILLAT, V. L.; MOUISEL, E.; ROBLOT, N.; MELKI, J. Inter- and intra-strain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol**, v.98(4), p.1258-63, **2005**.
4. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v.33(6), p.407-26, 2003.
5. BRICKLEY, G.; DOUST, J.; WILLIAMS, C.A. Physiological responses during exercise to exhaustion at critical power. **Eur J Appl Physiol**, v.88, p.146-151, 2002.
6. BROOKS, G. A. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.790-799, 2002.
7. CHASSAIN, A. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme á l'effort: application á la mesure des puissances de la fréquence cardiaque et de la lactatémie. **Science & Sports**, v.1, p.41-8, 1986.
8. DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP R G. **Basic and clinical biostatistic**. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.
9. GAESSER, G.A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exerc Sports Sci Rev**, v.24, p.35-70, 1996.
10. GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C. Y.; MELLO, M. A. R. 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, p.725-6, 1991.

11. 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. **Comp Biochem Physiol**, v.130A, p.21-7, 2001.
12. GOBATTO, C.A.; MANCHADO, F.B.; VOLTARELLI, F.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; MELLO, M.A.R. Non-invasive critical load determination in swimming rats: effects of muscle glycogen depletion. **Med. Sci. Sports Exerc (Suppl)**, v.37(5), p.S331, 2005.
13. HARRI, M.; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold expose for rats? **Acta Physiol Scand**, v.126, p.189-97, 1986.
14. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. **Int J Sports Med**, v.6, p.117-30, 1985.
15. HILL, D.W. The critical power concept. **Int J Sports Med**, v.16, p. 237-254, 1993.
16. JONES, A.M.; CARTER; H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Med**, v. 29, p. 373-6, 2000.
17. JONES, A.M.; DOUSTY, J.H. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8Km running performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, p.1304-13, 1998.

18. KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol**, v.42, p.25-34, 1979.
19. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.114 A, p.51-5, 1996.
20. MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int J Sports Med**, v.7, p.45-65, 1986.
21. MARANGON, L.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R; KOKUBUN, E. Utilization of an hiperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc (Suppl)**, v. 34, p.149. 2002.
22. MONOD, H.; SCHERER J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics** v.8, p.329-38, 1965.
23. MURDES, J.P.; BORTEL, R.; BLANKNHIN, E.P.; ROSSIN, A.A.; GARNIER, D.L. Rats models of type 1 diabetes: genetics, environment and autoimmunity. **Har J**, v. 45, p. 278-91, 2004.
24. OYONO-ENGUELLE, S.; MARBACH, J.; HEITZ, A. Lactate removal ability and graded exercise in humans. **J Appl Physiol**, v.17: 472-477, 1989.
25. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106A, p.285-9. 1993.

26. PRADA, F.J.P.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.A.M; GOBATTO, C.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao LAn. **Rev Bras Ciência Mov**, v.12 (2), p.29-34, 2004.
27. PRINGLE, J.S.M.; JONES, A. M. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. **Eur J Appl Physiol**, v.88, p.214-226, 2002.
28. SCALFANI, A., Animal models of obesity: classification and characterization. **Int J Obesity**, v.8, p.491-508 ,1984.
29. SCHNEIDER, D.A.; MCLELLAN, T. M.; GASS, G.C. Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.608-613, 2000.
30. SID-ALI, B.; VANDERWALLE, H.; CHAIR, K.; MOREAUX, A.; MONOD, H. Lactate steady state velocity and distance-exhaustion time relationship in running. **Arch Int Physiol Biochim Biophys**, v. 99(4), p.297-301, 2001.
31. SJÖDIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int J Sports Med**, v.2, p.23-6, 1981
32. TEGTBUR, U.; BUSSE, M.W.; BRAUMANN, K. M. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v.25, p.620-7, 1993.
33. VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.

34. WASSERMAN, K.; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am J Cardiol**, V.14; P. 844-852, 1964.

ESTUDO 4

DETERMINAÇÃO NÃO INVASIVA DA CARGA CRÍTICA EM RATOS: EFEITOS DA DEPLEÇÃO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR

NON-INVASIVE CRITICAL LOAD DETERMINATION IN SWIMMING RATS: EFFECTS OF MUSCLE GLYCOGEN DEPELTION

Manchado, F.B.^{1,2}, Gobatto, C.A.¹; Mello, M.A.R.¹

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil

2- Faculdades Integradas Einstein de Limeira- Fiel – Limeira – Brasil

Em análise no periódico “Applied Physiology Nutrition and Metabolism”

RESUMO

O presente estudo foi desenhado para avaliar os efeitos da depleção de glicogênio muscular na carga crítica (Ccrit) e capacidade de trabalho anaeróbio (CTA) em ratos sedentários. Foram utilizados dez ratos Wistar adultos, adaptados ao meio líquido. Cada rato foi submetido a 4 dias de teste (em estado alimentado e após 12 horas de jejum, utilizado para depletar concentrações de glicogênio muscular), consistindo de natação suportando cargas (C) contínuas equivalentes a 9%, 11%, 13% e 15% do peso corporal, atadas ao dorso, executadas até a exaustão em tanque cilíndrico (60 cm de diâmetro x 120 cm de profundidade), com a temperatura da água mantida em $31 \pm 2^\circ\text{C}$. Para estimar a Ccrit e CTA, uma curva hiperbólica (carga versus tempo de exaustão) foi linearizada para $C = C_{crit} + CTA/t_{lim}$, na qual a Ccrit e CTA são os coeficientes linear e angular, respectivamente, de acordo com Marangon et al. (2002). A Crit obtida, em porcentagem do peso corporal, foi $7,38 \pm 0,70$ em estado alimentado e $7,44 \pm 1,08$, após o jejum. A CTA (porcentagem do peso corporal segundos) foi $429,51 \pm 62,83$ e $283,62 \pm 111,82$, com os animais em estado alimentado e em jejum, respectivamente. A regressão média (R^2) obtida pelo modelo foi 0,98 no estado alimentado e 0,87 após jejum fisiológico. Após isso, todos os ratos (em estado alimentado) foram submetidos a 25 minutos de exercício contínuo suportando cargas equivalentes a 80%, 90% e 100% de Ccrit, com coletas sanguíneas efetuadas a cada 5 minutos. O lactato sanguíneo apresentou estabilização de $5,13 \pm 0,91\text{mmol/L}$, a 80% de Ccrit. A 90% e 100% de Ccrit, o lactato sanguíneo aumentou continuamente. A depleção dos estoques intramusculares de energia modificou a CTA sem alterar a Ccrit. Isso indica que o protocolo não invasivo utilizado é seguro e adequado para a avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos.

Palavras-chave: intensidade de exercício, protocolo não invasivo, natação de ratos, depleção de glicogênio, jejum.

ABSTRACT

The study evaluated the effects of muscle glycogen depletion on the critical load (CL) and the anaerobic work capacity (AWC) in sedentary rats. Ten Wistar rats were submitted to 4 tests, in the fed state and after a 12-hours fasting. The tests consisted of swimming exercise supporting loads (L) of 9, 11, 13 and 15% of body weight (bw), performed continuously until exhaustion, for the CL and AWC estimations. The hyperbolic curve load x time to exhaustion (t_{lim}) was linearized to $L = CL + AWC/t_{lim}$, where the CL and AWC were the linear and slope coefficients. All rats were submitted to 25 min of continuous exercise for maximal lactate steady state (MLSS) determination. The CL (%bw) and AWC (bw%.s) were 7.4 ± 0.7 and 429.5 ± 62.8 in the fed state, and $7.4 \pm 1.1\%$ and 283.6 ± 111.8 after fasting. The MLSS was obtained at 80% of CL in both conditions. The depletion of the muscle glycogen modified the AWC without changing CL. The protocol used was adequate for the aerobic determination, and the AWC was affected by 12-hours fasting.

Key words: exercise intensity, non-invasive protocol, swimming rats, glycogen depletion, fasting.

INTRODUÇÃO

Monod e Scherrer (1965) examinaram a relação da potência mecânica gerada em diferentes intensidades de esforços e suas respectivas durações até a exaustão. Dessa forma, postularam a existência de uma potência crítica (Pcrit) correspondente a máxima intensidade de exercício possível de ser mantida por um tempo teoricamente infinito. De acordo com alguns autores, exercícios acima da Pcrit provocam depleção da reserva de energia anaeróbia, denominada capacidade de trabalho anaeróbio (CTA), resultando em exaustão (DeVries et al., 1982; Jenkins e Quigley, 1990; Jenkins e Quigley, 1991; Bishop et al., 1995). Já em intensidades iguais ou inferiores à Pcrit, o trabalho pode ser mantido por um longo tempo sem exaustão, devido à estabilização de respostas fisiológicas como o lactato, pH e PCO₂ sanguíneos (McLellan e Cheung, 1992), bem como o consumo de oxigênio (Gaesser e Poole, 1996).

A relação da potência de trabalho versus tempo de exercício até a exaustão (t_{lim}) apresenta resposta hiperbólica. Portanto, a técnica não invasiva de determinação da Pcrit consiste em utilizar um dos parâmetros da função hiperbólica que relaciona a intensidade com o tempo máximo de exercício (Kokubun, 1996). Alguns modelos matemáticos têm sido empregados para descrever a relação entre trabalho-limite e tempo-limite (Housh et al., 1990; Hill e Smith, 1994; Gaesser et al., 1995), calculando suas variáveis (Pcrit e CTA). Considerando tratar-se de uma hipérbole retangular, é possível a linearização matemática da curva utilizando a potência do exercício e o valor inverso do tempo de exercício até a exaustão ou tempo limite ($1/t_{lim}$) (Hill, 1993). A partir dessa linearização são obtidos o y-intercepto e o coeficiente angular da reta de regressão, nos quais o primeiro corresponde a Pcrit e o segundo, à CTA.

Segundo Hill (1993) e Jenkins e Quigley (1990), a determinação da Pcrit e CTA é vantajosa pela característica não invasiva do procedimento, bem como por apresentar fácil aplicação e não necessitar de equipamentos e materiais de elevado valor financeiro. Com apenas

um ergômetro e um cronômetro é possível estimar as capacidades aeróbia (Pcrit) e anaeróbia (CTA). Dessa forma, aplicação desse método vem sendo difundida em diversas modalidades esportivas, cíclicas ou não, dentre elas a corrida, a natação, o futebol, caiaquismo e outros, provando sua utilidade na predição dos parâmetros que estão relacionados às determinações tradicionais de capacidade aeróbia ou anaeróbia. A utilização desse método não é apenas atrativa por sua característica não invasiva, mas por permitir avaliações específicas no esporte (Wakayoshi et al., 1992; Hill, 1993; Bishop e Jenkins, 1995, Morton e Billat, 2004).

Apesar da simplicidade de determinação, a Pcrit estimada por esse modelo já está bem consolidada e elucidada como um parâmetro representativo da capacidade aeróbia, sendo relacionada com o limiar de fadiga (DeVries et al., 1982), os limiares ventilatório e de lactato e o consumo máximo de oxigênio (Housh et al., 1991; Hill et al., 2002).

Diferente da Pcrit, a CTA ainda apresenta inúmeros questionamentos e dificuldade de validação. Segundo Billat (1992), McLellan e Cheung, (1992) e Moritani et al. (1981) a CTA representa a reserva energética disponível naturalmente no músculo e rapidamente mobilizável, correspondendo do mesmo modo à energia obtida pelos componentes fosfagênicos que são provenientes da reserva anaeróbia alática, da glicólise anaeróbia ou da utilização dos substratos originados das reações aeróbias, como o O₂ ligado à mioglobina. Apesar de alguns estudos encontrarem correlação da CTA com índices anaeróbios, dentre eles resultados do teste de Wingate (Gullett et al., 1998), déficit de oxigênio (Hill e Smith, 1994) e máximo déficit de oxigênio acumulado (MAOD) (Hill e Smith, 1994), diversos trabalhos não obtiveram sinal algum de que a CTA está relacionada com a condição anaeróbia (Bulbulian et al., 1996; Papoti et al., 2003). Dessa forma, há dificuldade em confiar nesse valor matemático como representativo de um parâmetro fisiológico, existindo a necessitando maiores investigações sobre suas implicações.

Existe um grande interesse na determinação da intensidade de esforço realizada por ratos durante exercício, já que esses animais vêm sendo utilizados em diversas áreas de pesquisa. Com a geração de modelos experimentais simulando patologias endócrino-metabólicas observadas em humanos (Scalfani, 1984; Murders et al., 2004), o desenvolvimento de avaliações físicas representa uma importante ferramenta para quantificar o esforço realizado por animais durante exercício e, como consequência, avaliar as respostas fisiológicas decorrentes dessa atividade física. Um número significativo de estudos tem buscado propor indicadores de performance em corrida (Pilis et al., 1994; Langfort et al., 1996, Manchado et al., 2005) e na natação de ratos (Gobatto et al., 1991; Gobatto et al., 2001; Voltarelli et al., 2002; Manchado et al., 2004, Gobatto et al., 2005), sendo muito aplicados os protocolos invasivos utilizando lactacidemia, semelhante ao sugeridos para humanos, na determinação do limiar anaeróbio. Entretanto, tais procedimentos impedem sucessivas avaliações dos animais devido ao custo elevado e grande dispêndio de tempo.

Em 2002, Marangon e colaboradores testaram a possibilidade de adaptar o modelo de potência crítica não invasivo, inicialmente sugerido para avaliação humana (Monod e Scherrer, 1965), à natação de ratos. Os resultados foram positivos, demonstrando aplicação desse modelo para avaliação da capacidade aeróbia em animais. Do mesmo modo, Billat et al. (2005) avaliaram camundongos em esteira rolante, utilizando o mesmo modelo. Porém, em ambos os casos, nenhuma manipulação ocorreu no sentido de obter maiores informações sobre o suposto parâmetro anaeróbio pelo modelo, a CTA.

Segundo Li et al. (1993), o jejum de 12 horas ou “jejum fisiológico” é responsável por alterações metabólicas intramusculares, resultando, entre outros efeitos, na depleção de estoques

de glicogênio muscular, decorrente da tentativa de manutenção de níveis glicêmicos normais no período de abstinência de alimento.

Se há uma relação direta entre a capacidade de trabalho anaeróbio (CTA) e os estoques de energia intramuscular, quais seriam as alterações promovidas pelo jejum fisiológico na determinação dos parâmetros sugeridos pelo modelo de potência crítica em ratos Wistar? Será que um modelo matemático é capaz de apresentar sensibilidade a alterações de condições alimentares? Nossa hipótese é que 12 horas de jejum reduz a CTA sem alterar a Ccrit e a MFEL dos ratos.

Com base nesses questionamentos, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos da depleção de glicogênio muscular na determinação da carga crítica (Ccrit) e capacidade de trabalho anaeróbio (CTA) em ratos Wistar sedentários. Especificamente foi pretendido comparar a Ccrit com a máxima fase estável de lactato e estudar a validade da CTA como um parâmetro anaeróbio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com a política do Colégio Americano de Medicina do Esporte. Dez ratos da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, pesando 320-400g no início do experimento e 420-500g no final, foram utilizados. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) em uma sala iluminada com ciclo claro escuro de 12:00-12:00hs e temperatura de 25°C. Os ratos receberam ração comercial própria para roedores (Labina-Purina) e água *ad libitum*,

exceto nos períodos de jejum fisiológico, nos quais a ração foi excluída da dieta dos animais, como posteriormente será descrito.

Adaptação ao meio líquido

Anteriormente à realização de todo o protocolo, os ratos foram adaptados ao meio líquido de forma padronizada. A adaptação ocorreu no período total de 15 dias ininterruptos, em um tanque cilíndrico com superfície lisa, medindo 60 cm de diâmetro por 120 cm de profundidade (Marangon et al., 2001), com a temperatura da água mantida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Harri e Kuusela, 1986). O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal sem, entretanto, promover adaptações fisiológicas decorrentes do treinamento físico.

Inicialmente os ratos foram inseridos em água rasa por três dias durante quinze minutos. Posteriormente, o nível da água foi aumentado, bem como o tempo de duração do esforço e a carga a ser sustentada pelo animal. Assim, no quarto dia, os ratos nadaram em água profunda por dois minutos, com acréscimo de dois minutos a cada dia até o décimo dia de adaptação. No décimo primeiro dia, os animais foram submetidos ao exercício de natação por 5 minutos suportando uma carga de 3% de seu peso corporal, com acréscimos de 5 minutos a cada dia, quando, no décimo quinto dia, encerrou-se a adaptação.

Protocolo Experimental

Determinação da Carga Crítica (Ccrit) e Capacidade de Trabalho Anaeróbio (CTA) com os animais alimentados

Todo o protocolo experimental foi realizado em condições ambientais idênticas às ocorridas durante a adaptação ao meio líquido, tanto a piscina profunda para a natação, quanto a temperatura da água.

Inicialmente os animais foram submetidos a um protocolo composto por quatro testes de natação em intensidades distintas, suportando cargas contínuas (C) equivalentes a 9, 11, 13 ou 15% do peso corporal atadas ao dorso. As cargas foram alternadas em intervalos de 48 horas e distribuídas aleatoriamente entre os ratos. Por ser não invasivo, o protocolo apresenta a característica exaustiva. Deste modo, para cada carga (C expressa em % do peso corporal) houve o registro, em segundos, do tempo individual de exaustão (t_{lim}), caracterizado como a não manutenção da atividade na água e mudança abrupta no padrão de movimento da natação dos animais. As cargas foram selecionadas de acordo com teste padronizado por Marangon et al. (2002), respeitando a necessidade da exaustão ocorrer entre 1 e 15 minutos de exercício (Bishop et al., 1998; Jenkins et al., 1998)

Como na avaliação em humanos, a carga crítica (C_{crit}) e a capacidade de trabalho anaeróbio (CTA) foram determinadas na relação intensidade do exercício (Carga) pelo tempo de exaustão (t_{lim}) através da hipérbole retangular $C = C_{crit} + CTA/t_{lim}$. Para o estabelecimento dos parâmetros C_{crit} e CTA, utilizou-se o ajuste linear da hipérbole ($C \times t_{lim}$), no qual a C_{crit} corresponde ao y-intercepto e a CTA, ao coeficiente angular da reta de regressão (Figura 4.1) (Hill, 1993).

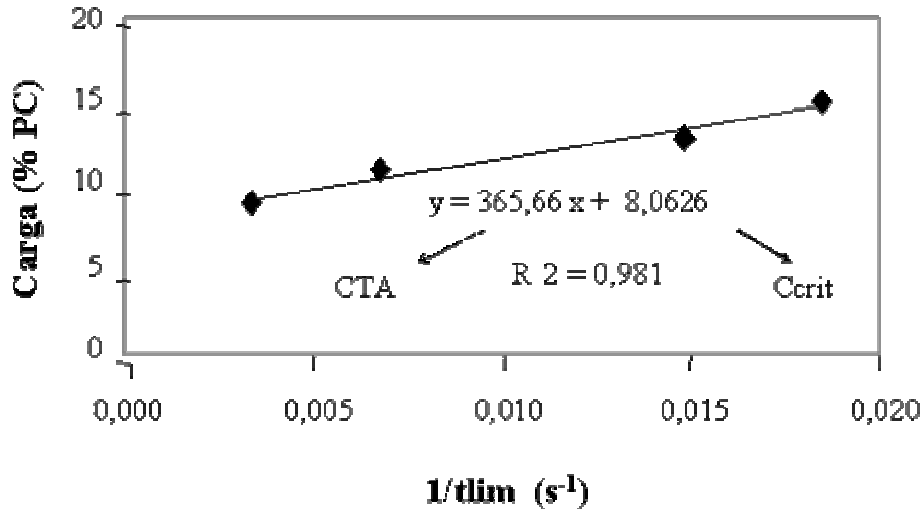


Figura 1. Exemplo da regressão linear Carga x $1/t_{lim}$ para um rato componente da amostra do estudo. O valor do coeficiente angular da reta de regressão equivale à CTA e o y-intercepto, à Ccrit desse animal.

Para testar se o modelo hiperbólico retangular pode ser aplicado ao exercício de natação nas condições propostas no teste, foram considerados coeficientes lineares (R^2) significativos dos ajustes ($P < 0,05$).

Determinação da Carga Crítica (Ccrit) e Capacidade de Trabalho Anaeróbio (CTA) após jejum fisiológico

Para promover a depleção dos estoques intramusculares de glicogênio, os ratos foram submetidos ao jejum fisiológico de 12 horas no período noturno precedente a todas as intensidades de esforços. A ração para roedores foi excluída dos comedouros às 18:00 horas e apenas a água foi mantida a disponibilidade dos animais. Os ratos foram submetidos ao mesmo teste anteriormente descrito, porém em condição fisiológica distinta. Para garantirmos a recuperação total dos estoques de energia intramusculares, as cargas aleatórias foram realizadas com intervalos de 72 horas.

As determinações de Ccrit e CTA foram realizadas utilizando-se o mesmo modelo matemático linear, para possível comparação dos resultados obtidos com os animais realizando o protocolo em condição alimentar normal e após jejum fisiológico.

Determinação da Máxima Fase Estável de Lactato

Para verificar a possível estabilização do lactato sanguíneo na intensidade de Ccrit estimada pelo modelo não invasivo, os ratos foram submetidos a 25 minutos de exercício contínuo nas cargas equivalentes a 80%, 90% e 100% de Ccrit, com amostras sanguíneas coletadas a cada 5 minutos. Esse procedimento ocorreu em dias alternados e as três cargas foram executadas com os animais alimentados e posteriormente após jejum fisiológico.

Considerou-se máxima fase estável de lactato a mais alta intensidade na qual o aumento da lactacidemia foi igual ou inferior à 1mmol/L, do 10º ao 25º minuto.

Amostras sanguíneas e análise

Durante os testes contínuos, amostras sanguíneas (25µl) foram extraídas da cauda do animal nos tempos já descritos e depositadas em tubos *Eppendorf* (capacidade de 1,5 ml), contendo 50µl de fluoreto de sódio (1%). Para evitar a diluição do sangue na água, os animais foram retirados do cilindro e secos, retornando ao meio líquido imediatamente após a coleta sanguínea. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas em um analisador de lactato (Modelo YSI 1500 Sport, Yellow Springs, OH, EUA).

Determinação do glicogênio muscular e hepático

Ao final do experimento, 10 animais jejuados foram submetidos ao exercício em intensidade de 100% Ccrit até a exaustão e imediatamente sacrificados por decapitação para determinação dos estoques de glicogênio muscular (gastrocnêmio e sóleo) e hepático pós-esforço exaustivo. Os músculos gastrocnêmio e sóleo foram selecionados devido sua importância no exercício de natação. Para valores de glicogênio controle, mais 30 ratos de mesma linhagem, idade e tamanho foram sacrificados: 10 ratos em repouso, após 12 horas de jejum; 10 em estado alimentado e 10 ratos alimentados, imediatamente após exercício exaustivo em intensidade equivalente à 100% de Ccrit.

Frações entre 26-35mg dos músculos sóleo e gastrocnêmio foram pesadas após o sacrifício do animal e imediatamente digeridas em banho a 100°C em 0,5ml de KOH 1N durante 20 minutos. Foram adicionados 20µl de solução saturada de n e o glicogênio foi precipitado através de duas passagens de 2,5ml de etanol quente, seguido de centrifugação, com o sobrenadante sendo descartado. O glicogênio precipitado foi ressuspensão em 4ml de água e a determinação colorimétrica realizada em 1ml de extrato, 20µl de fenol a 80% e 2,0ml de ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 490nm. Soluções de glicose de concentração conhecida foram utilizadas para as curvas de calibração (Dubois et al., 1956).

Análise Estatística

Inicialmente foi analisado o coeficiente de regressão do ajuste linear das curvas individuais Cx1/tlim, visando testar o modelo para nosso protocolo de exercício, com os animais alimentados e em jejum. Para a comparação das capacidades aeróbia (Ccrit) e anaeróbia (CTA) nas duas condições fisiológicas, foi utilizado o teste t de Student pareado. Na comparação entre os valores de glicogênio muscular em repouso e após exercício exaustivo, utilizou-se teste t não

pareado. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Em todos os procedimentos estatísticos, o nível de significância foi prefixado em $P < 0,05$ (Dawson-Saunders e Trapp, 1994).

RESULTADOS

A tabela 4.1 expressa os valores de tempos limites para os animais em diferentes estados alimentares. O teste-t pareado identificou que os tlims para as quatro intensidades foram superiores quando os ratos executaram o protocolo em estado alimentado.

A condição alimentar (alimentados ou após jejum fisiológico) não promoveu alterações na Ccrit, entretanto a CTA foi significativamente reduzida quando os animais executaram o protocolo após jejum fisiológico. Em ambas as condições alimentares, o ajuste linear foi significativo ($R^2 = 0,87-0,98$) (Tabela 4.2).

Na figura 4.2 é possível observar as curvas de lactato sanguíneo dos animais alimentados, submetidos ao teste contínuo em intensidades equivalentes a 80, 90 e 100% da Ccrit. A máxima fase estável de lactato foi obtida a 80% da Ccrit estimada pelo modelo não invasivo, em concentração $5,07 \pm 0,18$ mmol/L de lactato.

Não houve alteração significativa da máxima fase estável de lactato, em intensidade (80% de Ccrit) e concentração ($5,18 \pm 0,16$ mmol/L), quando os ratos executaram o teste contínuo precedido por jejum (Figura 4.2). Porém, nas cargas superiores (90% e 100% de Ccrit), todos os animais atingiram a exaustão anteriormente aos 25 minutos (Figura 4.3).

Tabela 4.1. Resultados dos tempos de exaustão (tlim) mensurados em segundos, obtidos em cada intensidade (% do peso corporal), com os ratos em duas condições distintas: alimentados e após 12 horas de jejum.

RATO	INTENSIDADES							
	ALIMENTADOS				JEJUM			
	9%	11%	13%	15%	9%	11%	13%	15%
1	240	120	70	53	125	92	69	46
2	266	126	80	62	103	73	65	38
3	216	116	80	41	116	60	64	29
4	612	175	90	70	316	145	69	54
5	137	94	78	52	98	67	36	15
6	410	142	80	66	196	77	40	68
7	270	126	78	65	150	62	46	44
8	324	120	77	58	189	85	54	58
9	240	100	73	50	119	63	22	31
10	187	99	75	50	129	53	37	34
média	290,0	121,8	78,1	56,7	154,1*	77,7*	50,2*	41,7*
epm	49,1	7,9	1,8	3,0	22,0	8,8	5,5	5,2

* Diferença significativa entre os valores obtidos com os animais alimentados e em jejum

Tabela 4.2. Resultados da carga crítica (Ccrit, em % do PC), capacidade de trabalho anaeróbio (CTA, em % pc.s) e os valores da regressão linear (R^2) obtidos para cada rato, em duas diferentes condições: alimentados e após 12 horas de jejum.

RATO	ALIMENTADOS			JEJUM		
	Ccrit	CTA	R^2	Ccrit	CTA	R^2
1	7,5	397,8	1,00	6,1	424,1	0,95
2	7,2	479,0	1,00	6,5	340,3	0,88
3	8,4	289,3	0,91	8,0	210,2	0,80
4	8,3	457,3	0,99	8,1	365,7	0,98
5	5,7	500,2	0,95	9,2	92,6	0,84
6	7,8	451,1	0,98	7,6	305,7	0,94
7	7,1	493,9	0,99	6,4	330,7	0,89
8	7,6	423,5	1,00	6,9	390,0	0,83
9	7,4	387,2	0,99	8,9	122,0	0,62
10	6,9	415,8	0,98	6,7	254,9	0,93
média	7,4	429,5	0,98	7,4	283,6*	0,87
epm	0,2	20,9	0,01	0,4	37,3	0,03

* Diferença significativa entre os valores obtidos com os animais alimentados e em jejum

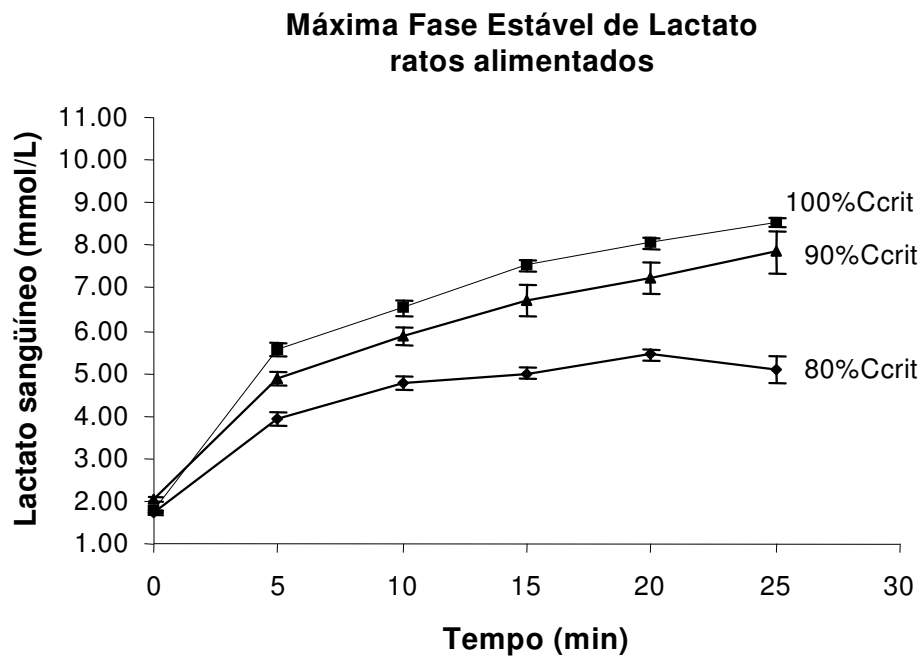


Figura 4.2. Máxima fase estável de lactato sangüíneo para os 10 ratos alimentados. Curvas de lactato em intensidades equivalentes a 80, 90 e 100% da Ccrit determinada por método não invasivo. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

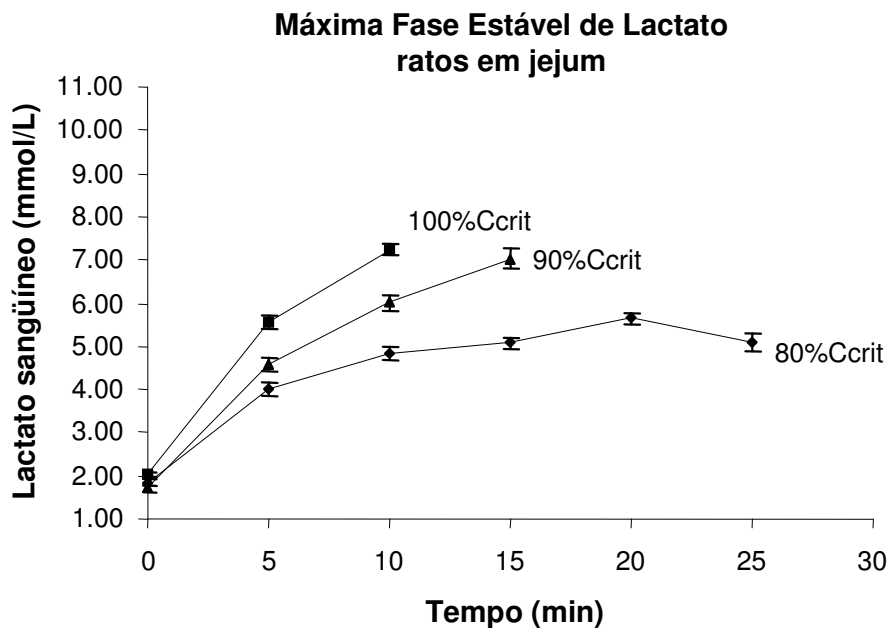


Figura 4.3. Máxima fase estável de lactato sangüíneo para os 10 ratos em jejum 12 horas. Curvas de lactato em intensidades equivalentes a 80, 90 e 100% da Ccrit determinada por método não invasivo. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

A tabela 4.3 apresenta as concentrações de glicogênio obtidas em músculos gastrocnêmio e sóleo e no fígado de ratos sacrificados em repouso e após exercício exaustivo, em ambos os estados, alimentados e após jejum. Houve significativa redução do glicogênio muscular após exercício exaustivo com os ratos alimentados. As 12 horas de jejum depletaram, de maneira significativa, os estoques musculares e hepático de glicogênio. Em ambas as condições (exaustão e jejum) a depleção de glicogênio não foi completa. A associação do jejum com exercício exaustivo aumentou as concentrações de glicogênio, quando comparada ao jejum sem exercício.

Tabela 4.3. Valores de glicogênio encontrados no gastrocnêmio, sóleo e fígado de ratos sacrificados em repouso (controle) e após exercício exaustivo (exercício) em ambos estados alimentares (alimentados e em jejum).

	Glicogênio (mg/100g)		
	Muscular		Hepático
	Gastrocnêmio	Sóleo	
Controle alimentado	0,53 ±0,05	0,44 ±0,03	4,94 ±0,34
Exercício alimentado	0,27 ±0,03 ^a	0,37 ±0,01	4,04 ±0,77
Controle jejum	0,18 ±0,03 ^a	0,16 ±0,03 ^{a,b}	2,24 ±0,27 ^{a,b}
Exercício jejum	0,34 ±0,05 ^{a,c}	0,33 ±0,05 ^{a,c}	2,91 ±0,62 ^{a,b}

Resultados expressos em média ± erro padrão da média. Diferença significativa entre: a) controle alimentado, b) exercício aleitado, c) controle jejum.

DISCUSSÃO

Protocolos e metodologias variadas vêm sendo utilizados para determinação da intensidade de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio. Nesse sentido, diversos procedimentos invasivos testados nas últimas décadas apresentam grande confiabilidade devido ao preciso controle de variáveis fisiológicas importantes (Kinderman et. al, 1979; Chassain, 1986; Tegtbur et al., 1993; Beneke, 2003). Entretanto, esses métodos apresentam limitações de aplicação prática, em ambientes clínicos ou esportivos, tanto pelo elevado custo quanto pela necessidade de domínio preciso da técnica.

O modelo de potência crítica sugerido por Monod e Scherrer (1965) fornece metodologia simplificada para a avaliação aeróbia e anaeróbia em seres humanos, motivo pelo qual tem sido alvo de um grande número de estudos laboratoriais e específicos em modalidades esportivas (Kolbe et al., 1995; Gullet et al., 1998; Pringle e Jones, 2002; Morton e Billat, 2004). Apesar de apresentar muitas vantagens, ainda existem deficiências e dificuldade de entendimento referente ao significado fisiológico dos parâmetros sugeridos por esse modelo matemático, especialmente com relação à capacidade de trabalho anaeróbio (CTA).

Utilizar uma técnica simples e não invasiva para avaliação aeróbia e anaeróbia em ratos parece significar um importante avanço na fisiologia do exercício, tanto para a obtenção de resultados representativos das capacidades metabólicas quanto para estimular a tentativa de validação e esclarecimento acerca do modelo.

Em nosso caso, optamos por manipular um estado metabólico modificando as condições alimentares dos animais durante o processo de avaliação não invasiva inicialmente sugerida para humanos. Desta forma, estimamos a Ccrit e CTA com os animais alimentados e após jejum fisiológico, causador de depleção das reservas intramusculares de energia.

No presente estudo, a manipulação do estado alimentar promoveu diferença significativa entre nos tempos limites de todas as intensidades, sendo o jejum a causa da redução de permanência do animal no exercício agudo de natação (Tabela 4.1).

Assim como proposto por Marangon et al. (2002), nossos achados também demonstram que a adaptação do protocolo não invasivo inicialmente sugerido para humanos (Monod e Scherrer, 1965; Hill, 1993) pode representar uma forma de avaliação da intensidade de esforço em natação de ratos. Resultados expressos na Tabela 4.2 comprovam a afirmação. Utilizando a reta de regressão linear da relação carga x $1/t_{lim}$, foram estimadas a C_{crit} (y-intercepto) e a CTA (coeficiente angular) individuais. Em consonância com resultados obtidos por Marangon et al. (2002), para todos os casos o ajuste matemático obtido foi satisfatório e estatisticamente significativo ($R^2=0,98-1,00$; $0,62-0,98$, com os ratos alimentados e após jejum, respectivamente), garantindo efetividade na linearização da hipérbole retangular (Hill, 1993). A C_{crit} estimada com os ratos no estado alimentado foi igual a $7,4 \pm 0,2\%$ do peso corporal. Em estudo anterior, resultados similares foram encontrados para ratos Wistar sedentários testados pelo mesmo modelo ($C_{crit} = 7,5 \pm 0,2\%$ pc) (Marangon et al., 2002).

O valor do parâmetro aeróbio fornecido pela regressão linear não foi modificado com a redução dos estoques de glicogênio muscular e hepático resultante do jejum fisiológico (Tabela 4.2). Esse dado revela que o modelo adotado apresenta consistência para o parâmetro, já que a capacidade aeróbia só deve alterar-se com o treinamento físico crônico ou modificações ambientais, tais como manipulação de concentrações e pressões de perfusão de O_2 . De acordo com pressupostos nos quais o modelo de potência crítica está baseado, alterações em estoques de energia intramuscular estão apenas relacionadas com a CTA (Bishop et al., 1995).

Utilizamos o método “padrão ouro” denominado máxima fase estável de lactato (Beneke et al., 1995; Beneke et al., 1996; Billat et al., 2003, Beneke et al, 2003) para testarmos se a Ccrit representa a mais alta intensidade de exercício possível de ser mantida por longo tempo com predominância do metabolismo aeróbio (Figura 4.2). No presente estudo, a MFEL de lactato foi obtida à concentração de $5,07 \pm 0,18\text{mmol/L}$, em intensidade correspondente a 80% de Ccrit (5,9% do pc, em média), sendo que em cargas equivalentes a 90% e 100%, a cinética de lactato sanguíneo não apresentou estabilização.

Resultados similares, tanto de intensidade de exercício associada à MFEL quanto de concentração de estabilização de lactato, são encontrados em outras referências. Gobatto et al. (2001) submeteram 27 ratos Wistar sedentários a seis testes contínuos de natação em cargas equivalentes a 5, 6, 7,8,9 e 10% do seu peso corporal. A MFEL foi obtida em concentração $5,5\text{mmol/L}$, em carga equivalente à 5%. Voltarelli et al. (2002), também utilizando a natação de ratos, observaram MFEL em carga $4,9 \pm 0,1\%$ do peso corporal, porém em concentração $7,17 \pm 0,16\text{mmol/L}$. Apesar disso, Marangon et al. (2002) obtiveram MFEL a 100% da carga crítica, o equivalente a $7,48 \pm 0,25\%$ do peso corporal dos animais. Pringle e Jones (2002) determinaram a potência equivalente à MFEL em humanos executando exercício em cicloergômetro e compararam essa intensidade à Pcrit e limiar de fadiga. Assim como em nosso trabalho, os autores verificaram que a Pcrit superestimou a potência de estabilização máxima do lactato sanguíneo, porém em apenas 10%.

Devido à característica sistemática do erro em 20% na determinação da Ccrit e a consonância com valores de MFEL mencionados em outros estudos (Gobatto et al, 2001; Voltarelli et al., 2002; Manchado et al., 2004), o modelo não invasivo pode ser utilizado para mensurar a capacidade aeróbia desde que haja um ajuste de 20% à carga obtida.

Como o esperado, o jejum fisiológico não promoveu alterações significativas em intensidade e concentração de MFEL (80% da Ccrit e $5,18 \pm 0,16$ mmol/L, respectivamente), porém, em cargas superiores, os ratos atingiram a exaustão entre o 10° e 15° minutos de exercício (Figura 4.3). De acordo com Billat et al. (2003), a MFEL delimita a intensidade de predominância entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio e, portanto, a via oxidativa apresenta maior importância para o sistema. Em intensidades superiores a essa, há grande contribuição do metabolismo anaeróbio. Isso pode explicar a igualdade entre as respostas de lactato sanguíneo nas duas diferentes condições alimentares apenas até a carga da MFEL, intensidade na qual redução de reserva anaeróbia parece não interferir na manutenção do exercício. A 90% e 100% da Ccrit, a energia proveniente dessa reserva apresenta importância extrema para continuidade do esforço e, estando o organismo debilitado pelo jejum fisiológico, a exaustão é atingida rapidamente.

O grande achado do presente estudo encontra-se na alteração da CTA com modificações na condição alimentar dos ratos (Tabela 4.2). Apesar da manutenção do y-intercepto, o coeficiente angular da reta de regressão foi significativamente inferior quando os animais realizaram a avaliação em jejum ($429,5 \pm 20,9$ e $283,6 \pm 37,3$ % pc.s, para os ratos alimentados e após jejum, respectivamente). Isso demonstra que o modelo matemático apresenta, ao menos em animais laboratoriais, sensibilidade às condições alimentares distintas, podendo a CTA estar realmente associada alguma alteração intramuscular de energia, como sugerido por DeVries e Moro (1981) e Green et al. (1994), em estudos com humanos.

Segundo Bishop et al. (1998) o organismo pode ser entendido como um modelo monocompartimental, no qual apenas em intensidades superiores à Ccrit, as reservas anaeróbias são significativamente utilizadas. De acordo com esse pressuposto, a exaustão ocorre por

esgotamento total dessas reservas. Nossos achados não permitem apoiarmos esse modelo, haja vista que, mesmo após exercício exaustivo, os ratos ainda apresentaram estoques intramusculares e hepáticos de glicogênio. Outro aspecto importante a ser observado é que o jejum foi capaz de reduzir de forma significativa os estoques energéticos intramusculares, porém, após o exercício exaustivo, ratos jejuados apresentaram valores elevados de glicogênio muscular (Tabela 4.3).

O jejum é responsável por alterações fisiológicas distintas. Em pesquisa laboratorial, Nikolovsky et al. (1996) mostraram que ratos jejuados, em recuperação de uma atividade física intensa, são capazes de repletar uma grande proporção de seus estoques de glicogênio muscular mesmo sem a ingestão alimentar. Fournier et al. (2002) credita essa ocorrência principalmente à utilização do lactato sanguíneo pela gliconeogênese. Por estar debilitado no sentido de possuir reservas reduzidas, o animal sente-se ávido por captação de glicose para o músculo durante o exercício, devido à alta taxa glicêmica e lactacidêmica nesse momento. Dessa forma, há a ocorrência de exaustão rapidamente, porém com estoques energéticos elevados.

O glicogênio hepático apresentou redução similar à observada em estoques musculares após 12 horas de jejum. Entretanto, esse parâmetro não foi modificado após exercício exaustivo em ambos os estados alimentares.

Esses resultados sugerem que a exaustão durante o exercício antecipa-se e é proveniente de um desequilíbrio intramuscular, não sendo causada por esgotamento total de reservas anaeróbias como reportado por Bishop et al. (1995). Desse modo, nós acreditamos que a CTA não deve ser interpretada como um estoque intramuscular de energia (ou capacidade), mas como um balanço sistêmico e um estado para o trabalho anaeróbio. Quando há equilíbrio nesse estado, o exercício é mantido.

Os resultados do presente estudo indicam que a depleção prévia de glicogênio hepático e muscular promovida pelo jejum modifica a capacidade de trabalho anaeróbio sem alterar a carga

crítica. Entretanto, a exaustão durante o exercício não é decorrente do esgotamento total desses estoques. Isso sugere que o protocolo não invasivo utilizado parece ser válido e adequado para a avaliação aeróbia de ratos sedentários. A CTA foi afetada por 12 horas de jejum, porém mais estudos são necessários para investigar o parâmetro anaeróbio oferecido pelo modelo matemático utilizado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio da “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 07070-5/2004), por financiar esse estudo”. O estudo contou também com o apoio dos órgãos de fomento CAPES e CNPq (Proc. 300270/2004-16) e auxílio técnico de José Roberto Rodrigues da Silva, Eduardo Custódio e à Clarice Yoshiko Sibuya.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc**, v.27(6), p.863-7, 1995.
2. BENEKE, R.; VON DUVILLARD, S. Determination of maximal lactate steady state response in selected sports events. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.28, p.241-243, 1996.
3. BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v.89, p.95-9, 2003.
4. BILLAT, V. Détermination d'une puissance critique aeróbie par l'a évolution de la lactatémie en régime continu d'exercice musculaire. **Science et Motricité**, v.16, p.3-11, 1992.

5. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v.33(6), p.407-26, 2003.
6. BILLAT, V. L.; MOUISEL, E.; ROBLOT, N.; MELKI, J. Inter- and intra-strain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol**, v.98(4), p.1258-63, 2005.
7. BISHOP, D.; JENKINS, D.G. The influence of recovery duration between periods of exercise on the Critical Power function. **Eur J Appl Physiol**, v. 2, p.15-20, 1995.
8. BISHOP, D.; JENKINS, D.G.; HOWARD, A. The critical power function is dependent on the duration of predictive exercise tests chosen. **Int J Sports Med**, v.19, p.125-129, 1998.
9. BULBULLIAN, R.; JEONG, J.; MURPHY, M. Comparition of anaerobic components of the wingate and critical power tests in males and females. **Med Sci Sports Exerc** v.28(10), p.1336-1341, 1996.
10. CHASSAIN, A. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme á l'effort: application á la mesure des puissances de la frequence cardiaque et de la lactatémie. **Science & Sports**, v.1, p.41-8, 1986.
11. DAWSON-SAUNDERS, B.; TRAPP, R. G. Basic and clinical biostatistic. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.
12. DeVRIES, H.A.; MORITANI, T.; NAGATA, A.; MEGNUSSEN, K. The relation between critical power and neuromuscular fatigue as estimated from eletromyographic data. **Ergonomics**, v.25(8), p.783-791, 1982.

13. DUBOIS B., et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substabnces. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-6, 1956.
14. FOURNIER, P.A.; BRÄU, L.; FERREIRA, L.D.M.C.; FAIRCHILD, T.; RAJA, G.; JAMES, A.; PALMER, T.N. Glycogen resynthesis in the absence of food ingestion during recovery from moderate or high intensity physical activity: novel insights from rat and human studies. **Comp Bioch Physiol**, v.133(3), p.755-763, 2002.
15. GAESSER, G.A., CARNEVALE, T.J., GARFUNKEL, A., WLATER, D.O., WOMACK, C.J. Estimation of critical power with nonlinear and linear models. **Med Sci Sports Exerc**, v., p.1430-1437, 1995.
16. GAESSER, G.A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exerc Sports Sci Rev**, v.24, p.35-70, 1996.
17. GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C. Y.; MELLO, M. A. R. 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, p.725-6, 1991.
18. 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. **Comp Biochem Physiol**, v.130A, p.21-7, 2001.
19. GOBATTO, C.A.; MANCHADO, F.B.; VOLTARELLI, F.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; MELLO, M.A.R. Non-invasive critical load determination in swimming rats: effects of muscle glycogen depletion. **Med. Sci. Sports Exerc (Suppl)**, v.37(5), p.S331, 2005.

20. GREEN, S.; DAWSON, B.T.; GOODMAN, C.; CAREY, M.F. Y-intercept of the maximal work-duration relationship and anaerobic capacity in cyclists. **Eur J Appl Physiol**, v.69, p.550-556, 1994.
21. GULLET, L.J.N.; HOUSH, T.J.; JOHNSON, G.O. A comparison between methods of measuring anaerobic work capacity. **Ergonomics**, v.33(10), p.1413-1419, 1998.
22. HARRI, M.; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol Scand**, v.126, p.189-97, 1986.
23. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. **Int J Sports Med**, v.6, p.117-30, 1985.
24. HILL, D.W. The critical power concept. **Int J Sports Med**, v.16, p. 237-254, 1993.
25. HILL, D.W.; SMITH, J.C. A method to ensure the accuracy of estimates of anaerobic capacity derived using the critical power concept. **J Sports Med Phys Fitness**, v.34, p.23-37, 1994.
26. HILL, D.; POOLE, D.; SMITH, J. The relationship between power and the time to achieve VO_{2max} . **Med Sci Sports Exerc**, v.34(4), p.709-714, 2002.
27. HOUSH, J.D.; HOUSH, T.J.; BAUGE, S.M. A methodological consideration for the determination of critical power and anaerobic work capacity. **Research Quarterly For Exercise and Sport**, v.61, p.406-409, 1990.

28. HOUSH, T.J.; DeVRIES, H.A.; HOUSH, D.J.; TICHY, M.W.; SMITH, K.D.; TICHY, A.M. The relationship between critical power and onset of blood lactate accumulation. **J Sports Med Phys Fitness**, v.31, p.31-36, 1991.
29. JENKINS, D.G.; QUIGLEY, B.M. Blood lactate in trained cyclists during cycle ergometer at critical power. **Eur J Appl Physiol**, v.61, p.278-283, 1990.
30. JENKINS, D.G.; QUIGLEY, B.M. The y-intercept of critical power function as a measure of anaerobic work capacity. **Ergonomics**, v.34, p.13-22, 1991.
31. JENKINS, D.G.; KRETEK, K.; BISHOP, D. The duration of predicting trials influences time to fatigue at critical power. **J Sci Sports Med**, v.1, p.213-218, 1998.
32. KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol**, v.42, p.25-34, 1979.
33. KOKUBUN, E. Velocidade crítica como estimador do limiar anaeróbio na natação. **Rev Paulista Educação Física**, v.10, p.5-20, 1996.
34. KOLBE, T.; DENNIS, S.C.; SELLEY, E.; et al, The relationship between critical power and running performance. **J Sports Sci**, v.13, p.265-269, 1995.
35. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.114 A, p.51-5, 1996.

36. LI, JING; STILLMAN, J.S; CLORE, J.N; BLACKARD, W.G. Skeletal muscle lipids and glycogen mask substrate competition (Randle cycle). **Metabolism**, v.42(4), p.451-456, 1993.
37. MANCHADO, F.B; GOBATTO, C.A.;VOLATRELLI, F.A.; CONTARTEZE, R.V.L; MELLO, M.A.R. Padronização de protocolo não exaustivo para determinação da carga crítica em modelo experimental utilizando animais. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento (supp)**, p.48, 2004.
38. MARANGON, L.;GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R; KOKUBUN, E. Utilization of an hyperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc (Suppl)**, v. 34, p.149. 2002.
39. McLELLAN, T.M.; CHEUNG, K.S.Y. A comparative evaluation of the individual anaerobic threshold and critical power. **Med Sci Sports Exerc**, v.24, p.543-550, 1992.
40. MONOD, H.; SCHERER J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics** v.8, p.329-38, 1965.
41. MORITANI, T.; NAGATA, A.; DeVRIES, H.A.; MURO, M. Critical power as a measure of physical work capacity and anaerobic threshold, **Ergonomics**, v.24, p.339-350, 1981.
42. MORTON, H.; BILLAT, V. The critical power model for intermittent exercise. **Eur J Appl Physiol**, v.91:303-307, 2004.
43. NIKOLOVSKI, S.; FAULKNER, D.L.; PALMER, T.N; FOURNIER, P.A. Muscle glycogen repletion from endogenous carbon sources during recovery from high intensity exercise in the fasted rat. **Acta Physiol. Scand**, v.157, p.427-434, 1996.

44. PAPOTI, M. Efeitos do período de polimento sobre performances aeróbia e anaeróbia de nadadores após ciclo experimental de treinamento. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2003.
45. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106A, p.285-9. 1993.
46. PRINGLE, J.S.M.; JONES, A. M. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. **Eur J Appl Physiol**, v.88, p.214-226, 2002.
47. SJÖDIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int J Sports Med**, v.2, p.23-6, 1981.
48. TEGTBUR, U.; BUSSE, M.W.; BRAUMANN, K. M.. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v.25, p.620-7, 1993.
49. VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.
50. WAKAYOSHI, K.; ILKUTA, K.; YOSHIDA, T.; UDO, M.; HARADA, T.; MORITANI, T.; MUTOH, Y. et al. Determination and validity of critical velocity as an index of swimming performance in the competitive swimmer. **Eur J Appl Physiol**, v.64, p.153-157, 1992.
51. WASSERMAN, K.; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am J Cardiol**, V.14; P. 844-852, 1964.

ESTUDO 5

DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE CRÍTICA E CAPACIDADE ANAERÓBIA DE RATOS CORREDORES

DETERMINATION OF CRITICAL VELOCITY AND ANAEROBIC CAPACITY OF RUNNING RATS

Fúlvia de Barros Manchado^{1,2}, Claudio Alexandre Gobatto¹, Ricardo Vinícius Ledesma
Contarteze¹, Maria Alice Rostom de Mello¹

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil

2- Faculdades Integradas Einstein de Limeira- FIEL, Limeira – São Paulo - Brasil

3- Faculdades Integradas de Bauru – FIB, São Paulo - Brasil

Submetido ao periódico “Medicine & Science in Sports & Exercise”

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi validar um protocolo não-invasivo para a determinação da capacidade aeróbia (velocidade crítica) e anaeróbia (capacidade de trabalho anaeróbio) de ratos corredores. O modelo de potência crítica sugerido por Monod e Scherrer (1965) para avaliação humana e descrito em estudos prévios por nosso grupo de pesquisa para avaliação aeróbia na natação de ratos foi adaptado à corrida em esteira rolante. Após seleção e adaptação ao exercício de corrida em esteira (15 dias), treze ratos Wistar com 100 dias foram submetidos a 4 testes em velocidades de 25, 30, 35 e 40m/min, continuamente até a exaustão. Para estimar a velocidade crítica (V_{crit}) e a capacidade de corrida anaeróbia (CCA), a hipérbole (velocidade vs. tempo de exaustão) foi linearizada por $V = V_{crit} + CCA/t_{lim}$, onde a V_{crit} e a CCA são, respectivamente, o coeficiente linear e o coeficiente angular da reta de regressão. Para verificar se a V_{crit} estimada foi equivalente a máxima intensidade de exercício aeróbio, os ratos foram submetidos ao teste de máxima fase estável de lactato (MFEL), composto por 3 testes de corrida contínua (25 minutos) a 15, 20 e 25 m/min, com coletas sanguíneas a cada 5 minutos de exercício. A V_{crit} foi obtida em $22,8 \pm 0,7$ m/min e a CCA foi equivalente à $26,8 \pm 2,6$ m. A MFEL foi observada em intensidade de 20m/min, com concentração lactacidêmica de $3,84 \pm 0,31$ mmol/L. A 15 m/min, o lactato sanguíneo também estabilizou, porém em concentrações inferiores ($3,17 \pm 0,36$ mmol/L). Houve um aumento progressivo da lactacidemia na velocidade 25m/min e alguns animais não suportaram concluir o teste. A V_{crit} e a MFEL foram diferentes, porém altamente correlacionadas ($r=0,81$). Esses resultados indicam que o protocolo não invasivo proposto no presente estudo pode ser utilizado para avaliação aeróbia de ratos corredores, com pequenos ajustes sendo efetuados. No entanto, a CCA ainda requer mais investigações.

Palavras-chave: avaliação aeróbia e anaeróbia, protocolo não-invasivo, corrida em esteira rolante, ratos Wistar.

ABSTRACT

For obvious reasons, a large number of studies involving exercise is conducted in laboratory animals, mainly rats. Therefore, it is necessary to develop methods for physical evaluation of exercised rats. The aim of the present study was to validate a non-invasive protocol for determination of aerobic capacity (critical velocity) and anaerobic capacity (anaerobic work capacity) of treadmill running rats. For this, the critical power model suggested by Monod and Scherrer for human evaluation and described in previous studies by our group for swimming rats evaluation was adapted for running rats. After becoming familiarized with treadmill running (15 days), thirteen 100 days old male Wistar rats were submitted to four exercise tests, consisting in running at 25, 30, 35 and 40m/min, continuously until exhaustion. For the critical velocity (CV) and anaerobic running capacity (ARC) estimations, the hyperbolic curve (velocity versus time to exhaustion) was linearized to $V = CV + ARC/t_{lim}$, where the CV and ARC were linear and slope coefficients, respectively. To test if the CV was equivalent to the maximal aerobic intensity, the rats were also submitted to the maximal lactate steady state test (MLSS) composed by three 25 minutes continuous running at 15, 20 and 25m/min, with blood collection every 5 minutes. The CV was obtained at 22.8 ± 0.7 m/min and the ARC, at 26.8 ± 2.6 m. The MLSS was observed at 20m/min intensity, with blood lactate 3.84 ± 0.31 mmol/L. At the 15 m/min velocity, the blood lactate also stabilized, but at a lower concentration (3.17 ± 0.36 mmol/L). There was a progressive increase in blood lactate concentration at 25m/min velocity and some animals reached exhaustion between the 10th and 25th minute of exercise. The CV and MLSS were different but presented high and significant correlation ($r=0.81$). These results indicate that the non-invasive protocol can be used for aerobic running rats evaluation, with small adjustment, but the ARC should still require further investigation.

Key words: aerobic and anaerobic evaluation, non-invasive protocol, treadmill running, Wistar rats.

INTRODUÇÃO

A determinação da transição entre a predominância metabólica aeróbia e anaeróbia no fornecimento de energia para o exercício é extremamente importante em aspectos relacionados à avaliação da performance esportiva e treinamento, bem como para o tratamento de fisiopatologias. Por esse motivo, muitos estudos vêm sendo conduzidos nas últimas décadas, estabelecendo protocolos de avaliação capazes de identificar essa zona metabólica de transição (Wasserman et al., 1964; Kinderman et al., 1979; Sjödín e Jacobs, 1981; Chassain, 1986; Tegtbur et al., 1993). Um problema bem identificado na maioria desses protocolos é a necessidade de procedimentos invasivos e/ou com elevado custo financeiro.

Em 1965, Monod e Scherrer observaram que a potência mecânica gerada em diferentes intensidades de esforço e seus respectivos tempos de duração até a exaustão apresentam uma relação matemática hiperbólica. Com base nessa observação, esses autores postularam a existência de uma potência crítica (P_{crit}), equivalente à máxima potência individual que pode ser mantida, teoricamente, por período infinito de tempo e desenvolveram o “Modelo de potência crítica”.

Moritani et al. (1981) também estenderam o conceito de potência crítica ao exercício de ciclismo, identificando uma característica anaeróbia do y-intercepto da relação trabalho-tempo, denominado capacidade de trabalho anaeróbio ou CTA.

A relação potência vs. tempo de exercício até a exaustão (t_{lim}) apresenta resposta hiperbólica. Dessa forma, o método não invasivo de determinação da P_{crit} consiste em utilizar um dos parâmetros da função hiperbólica que relaciona intensidade de exercício e tempo máximo de execução da atividade até a exaustão. Alguns modelos matemáticos têm sido aplicados para descrever a relação entre trabalho limite e tempo limite ou tempo de exaustão (Housh et al., 1990; Hill et al., 1994; Gaesser et al., 1995; Bishop et al., 1998), calculando suas

variáveis (Pcrit e CTA). A linearização matemática da curva hiperbólica é possível utilizando a potência de exercício e o inverso dos valores de tempo até exaustão (t_{lim}) (Hill, 1993). Com base nessa linearização, o y-intercepto e a inclinação da reta de regressão são obtidos, no qual o primeiro corresponde à Pcrit e o segundo equivale à CTA.

Esse modelo matemático, originalmente proposto por Monod e Scherrer (1965), tem sido muito investigado nas últimas décadas. De acordo com Hill (1993), Jenkins e Quigley (1990) e Jenkins et al. (1998) a determinação de Pcrit e CTA apresenta importantes vantagens devido à característica não invasiva do procedimento, bem como facilidade em sua aplicação e o reduzido custo financeiro com materiais e equipamentos nessa avaliação. Com apenas um ergômetro e um cronômetro é possível estimar as capacidades aeróbia (Pcrit) e anaeróbia (CTA). Desse modo, a aplicação do método não invasivo tem sido estendida à inúmeras modalidades esportivas, dentre elas corrida, natação, futebol e caiaque, facilitando a avaliação aeróbia e anaeróbia sem a necessidade da utilização de protocolos convencionais. O uso desse método, portanto, não é apenas atraente por sua característica não invasiva, mas também por sua intensa utilização no ambiente esportivo (Wakayoshi et al., 1992; Hill, 1993; Green et al., 1994; Bishop e Jenkins, 1995; Morton et al., 2004).

Apesar da simplicidade em sua determinação, a Pcrit é altamente correlacionada com parâmetros de capacidade aeróbia em humanos, tais como limiar ventilatório, limiar anaeróbio lactacidêmico, consumo máximo de oxigênio (Housh et al., 1991; Hill et al., 2002), limiar de fadiga (DeVries et al., 1982) e máxima fase estável de lactato (Pringle e Jones, 2002).

Numerosos estudos vêm sendo conduzidos com modelos experimentais utilizando animais, especialmente ratos, com o objetivo de verificar as respostas fisiológicas ao exercício e ao treinamento físico. Entretanto, poucas avaliações físicas são utilizadas para controlar a

intensidade de exercício em animais devido ao reduzido número de protocolos destinados à essa amostra.

Nas últimas décadas, nosso grupo de pesquisa adaptou e desenvolveu novos métodos para avaliação de roedores em exercício de natação e corrida. Esses protocolos incluem teste incremental para ratos nadadores (Gobatto et al., 1991), protocolo de máxima fase estável de lactato para avaliação de ratos sedentários e treinados em natação (Gobatto et al., 2001), teste de lactato mínimo adaptado à natação (Voltarelli et al., 2002) e máxima fase estável de lactato em ratos corredores (Manchado et al., 2005) e camundongos corredores (Ferreira et al., 2007). Em 2002, Marangon et al. testaram a adaptação do modelo não-invasivo de potência crítica, inicialmente sugerido para avaliação humana (Monod e Scherrer, 1965), para natação de ratos. Os resultados foram satisfatórios, demonstrando a adequação desse modelo para avaliação da capacidade aeróbia de animais. Recentemente, Billat et al. (2005) estimaram a velocidade crítica de camundongos através da utilização do modelo não invasivo de potência crítica.

Devido à simplicidade na determinação de P_{crit} e sua elevada correlação com a máxima fase estável de lactato, considerada padrão ouro para avaliação da capacidade aeróbia (Beneke, 2003; Billat et al., 2003), o presente estudo foi delineado para validar o modelo de potência crítica como ferramenta de avaliação aeróbia (velocidade crítica) e anaeróbia (capacidade de corrida anaeróbia) em ratos corredores.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas éticas de utilização e manipulação de animais sugeridas pelo Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM). Treze ratos Wistar com 90 dias, pesando 438 ± 27 g foram utilizados. Durante todo o período experimental, os animais receberam ração comercial para roedores (Labina-Purina) e água *ad libitum*. Os ratos foram alojados em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola), em um biotério com ciclo claro-escuro (06:00hs as 18:00hs) com temperatura controlada (25°C).

Seleção dos ratos corredores e adaptação à corrida em esteira rolante

O processo de seleção dos ratos corredores ocorreu em dez dias consecutivos, com os animais correndo a 15m/min, por cinco minutos. Foram selecionados para compor a amostra, os ratos que apresentaram resposta positiva ao estímulo por nove ou dez vezes. Posteriormente, os animais selecionados foram adaptados ao exercício de corrida em esteira rolante. A adaptação consistiu na execução de corrida por três semanas, 5 dias/semana, com duração e velocidade sendo aumentadas progressivamente. A proposta da adaptação foi a redução do estresse dos animais frente ao exercício sem promoção de adaptações fisiológicas advindas do treinamento físico.

Procedimento Experimental

Determinação da velocidade crítica (V_{crit}) e capacidade de corrida anaeróbia (CCA) em esteira rolante

Os animais foram inicialmente submetidos ao protocolo composto por 4 testes de corridas exaustivas em velocidades distintas equivalentes à 25, 30, 35 e 40m/min. As velocidades foram alternadas em intervalos de 48 horas e distribuídas randomicamente entre os ratos. Para cada velocidade (V expressa em m/min), foi registrado o tempo de exaustão em segundos (tlim). As velocidades foram seleccionadas para que a exaustão voluntária dos animais ocorresse entre 1 e 15 minutos de exercício (Jenkins et al., 1991; Bishop et al., 1998).

Como para humanos, a velocidade crítica (Vcrit) e a capacidade de corrida anaeróbia (CCA) foram determinadas por relação entre intensidade de exercício (velocidade – V) e tempo de esforço até a exaustão (tlim), através da função matemática hiperbólica ($tlim = CCA / (V - Vcrit)$). Para estimar a Vcrit e CCA, utilizou-se a linearização da hipérbole ($V = CV + CCA / tlim$), na qual Vcrit corresponde ao Y-intercepto e CCA, à inclinação da reta de regressão (Figura 5.1) (Hill, 1993).

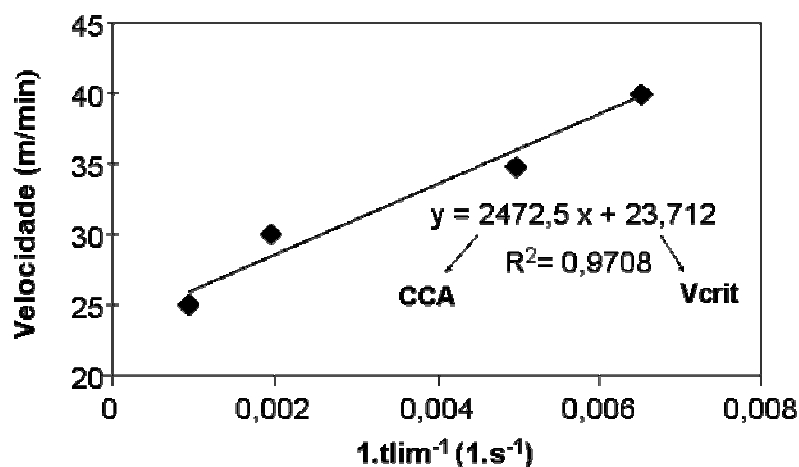


Figura 5.1. Exemplo da regressão linear (velocidade vs. $1/tlim^{-1}$) obtida para um rato. O valor da angulação da reta de regressão corresponde à capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e o Y-intercepto, à velocidade crítica (Vcrit) desse animal.

Determinação da máxima fase estável de lactato

Para verificar a possível estabilização das concentrações de lactato sanguíneo na intensidade de V_{crit} estimada pelo modelo não-invasivo de potência crítica, os ratos foram submetidos à 25 minutos de exercício contínuo em velocidades de 15, 20 e 25 m/min. Os testes contínuos também foram separados por 48 horas e a seqüência de realização dessas velocidades foi distribuída de maneira randômica, sem repetição de uma mesma velocidade para um mesmo animal. Cada teste contínuo consistiu na execução de 25 minutos de corrida em esteira rolante ou exercício até a exaustão. Amostras de sangue para determinação do lactato sanguíneo foram coletadas em seis distintos tempos de atividade: antes do início do exercício e a cada 5 minutos durante o teste. A mais alta intensidade de exercício na qual o aumento das concentrações sanguíneas de lactato foi igual ou inferior à 1 mmol/L do 10º ao 25º minuto de exercício foi considerada máxima fase estável de lactato (Beneke, 2003, Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2005).

Amostras sanguíneas e análises

Durante os testes, amostras de sangue (25µl) foram extraídas da extremidade distal da cauda dos animais nos períodos anteriormente descritos e depositadas em tubos *Eppendorf* (capacidade de 1,5ml) contendo 50µl de fluoreto de sódio (1%). As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas em analisador de lactato (Lactímetro YSI, modelo 1500 Sport, Yellow Springs, OH, USA).

Análise Estatística

O coeficiente de regressão linear individual do ajuste V vs. $1/t_{lim}$ foi inicialmente analisado com o objetivo de testar o modelo adaptado à ratos. Também houve aplicação do teste de normalidade. Para comparar os valores de velocidade crítica (V_{crit}) e máxima fase estável de lactato (MFEL), foi utilizado o teste t-Student. O teste de Correlação de Pearson identificou possíveis correlações entre V_{crit} e MFEL. Em todos os casos, estabeleceu-se nível de significância de $P < 0,05$ (Dawson-Saunders e Trapp, 1994).

RESULTADOS

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. A figura 2 representa graficamente os tempos de exaustão (t_{lim}) para os animais em diferentes velocidades. Os valores de t_{lim} observados no estudo apresentam comportamento hiperbólico e estão dentro da faixa sugerida por Bishop et al. (1998) e Jenkins et al. (1998). O teste-t identificou que os tempos limites para cada velocidade foram diferentes.

A tabela 5.1 apresenta os resultados individuais de V_{crit} e CCA estimadas pelo modelo não invasivo proposto no presente estudo e os coeficientes lineares dos ajustes realizados (R^2). A V_{crit} (m/min) and CCA (m) obtidas foram, respectivamente, $22,8 \pm 0,7$ e $26,81 \pm 2,58$, com significantes ajustes lineares ($R^2 = 0,89 \pm 0,8$).

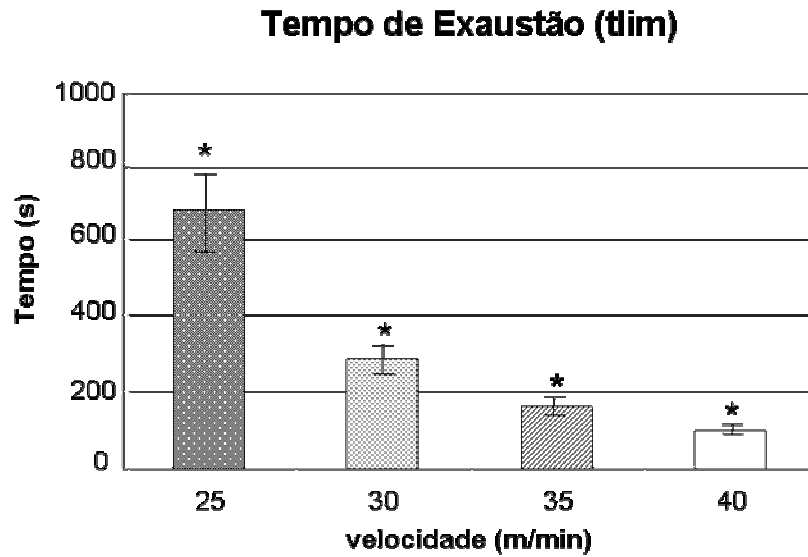


Figura 5.2. Tempo de exaustão (t_{lim}) obtido em quatro distintas intensidades. Os resultados estão expressos em média ± epm. * Diferença significativa entre todos os valores (P<0,05).

Tabela 5.1. Resultados individuais de velocidade crítica (V_{crit}) e capacidade de corrida anaeróbia (CCA) dos ratos, estimadas por procedimento não invasivo e coeficiente de regressão linear (R²).

RATOS	V_{crit} (m/min)	CCA (m)	R²
1	25,1	43,81	0,85
2	27,1	11,16	0,87
3	23,7	41,21	0,97
4	20,8	19,77	0,99
5	21,9	27,59	0,92
6	17,5	35,99	0,88
7	22,2	22,54	0,80
8	22,6	15,76	0,97
9	24,1	26,09	0,73
10	21,8	25,77	0,83
11	20,7	36,96	0,97
12	25,2	19,36	0,90
13	23,4	22,44	0,92
	22,8	26,81	0,89
	0,7	2,58	0,08

Resultados expressos em média ± epm.

Os animais apresentaram MFEL em concentração de $3,84 \pm 0,31$ mmol/L, na velocidade de corrida 20m/min. A 15m/min também houve estabilização do lactato sanguíneo, porém em menores concentrações ($3,17 \pm 0,36$ mmol/L). Houve aumento progressivo nas concentrações de lactato sanguíneo em velocidade 25m/min e alguns animais não suportaram concluir o tempo total de exercício pré-determinado (Figura 5.3).

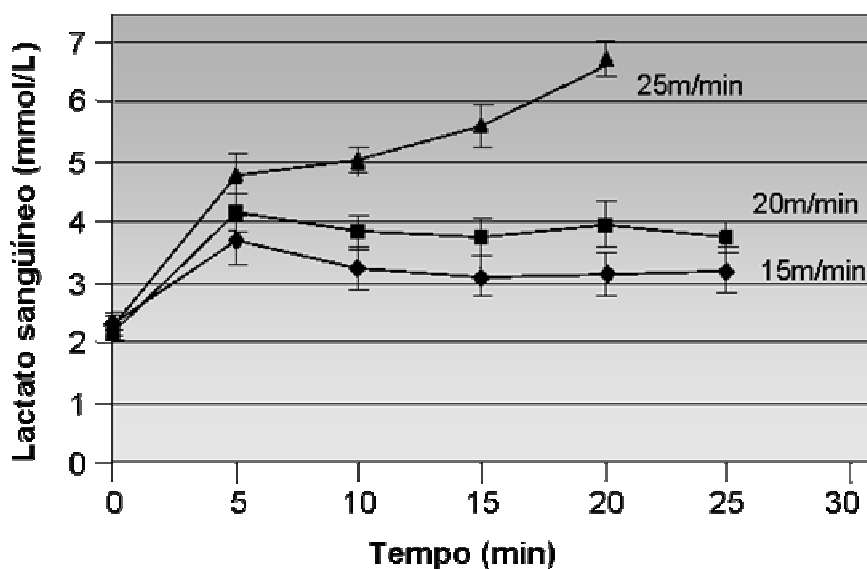


Figura 5.3. Máxima fase estável de lactato de 13 ratos. Os resultados estão expressos em concentrações médias de lactato sanguíneo durante corrida contínua a 15, 20 e 25 m/min (média \pm epm).

As intensidades de V_{crit} e MFEL não foram diferentes, mas o modelo não-invasivo superestimou a MFEL 10%, aproximadamente.

DISCUSSÃO

O modelo de potência crítica proposto por Monod e Scherrer (1965) é caracterizado por uma metodologia simplificada, aplicada na avaliação aeróbia e anaeróbia de humanos. Por essa razão, o método tem sido muito utilizado em estudos em laboratório e específicos para diversas modalidades esportivas (Gullet et al., 1998; Pringle e Jones, 2002; Morton e Billat, 2004).

Animais laboratoriais são ferramentas importantes em pesquisas envolvendo exercício. Entretanto, apesar de fundamental para o entendimento de respostas fisiológicas, poucos estudos determinam a real intensidade de esforço aplicada a ratos em trabalhos com natação e corrida em esteira rolante.

Devido à simplicidade e riscos reduzidos, o método não-invasivo parece ser adequado para avaliação da condição aeróbia e anaeróbia de animais, especialmente para o fornecimento de subsídios em dosagens de carga de trabalho associadas à respostas fisiológicas no exercício. No presente estudo, nós selecionamos a atividade de corrida em esteira rolante e adaptamos o modelo de não-invasivo de potência crítica para avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos sedentários.

De acordo com Monod e Scherrer (1965), em estudo realizado com humanos, a potência mecânica produzida em diferentes intensidades de esforço e suas respectivas durações até a exaustão (t_{lim}) apresentam uma relação hiperbólica. Na Figura 5.2 é possível observar que o tempo de exercício até a exaustão em diferentes velocidades de corrida caracteriza-se por resposta hiperbólica similar à observada em humanos. Em velocidades superiores, o tempo de exaustão foi reduzido. Também é possível observar que o tempo de exaustão em todas as intensidades utilizadas ocorreu entre o 1^o e 15^o minuto de exercício, como sugerido por Bishop et al. (1998) e Jenkins et al. (1998).

Corroborando com Marangon et al. (2002), utilizando natação de ratos e Billat et al. (2005) em seu estudo com camundongos corredores, nossos achados também demonstram que a adaptação do protocolo não-invasivo inicialmente sugerido para avaliação humana (Monod e Scherrer, 1965; Hill, 1993) pode representar um ótimo caminho para quantificar a intensidade de exercício executada por animais. A Tabela 5.1 expressa resultados que sustentam essa afirmação. Em concordância com os achados de Marangon et al. (2002), para todos os casos as regressões lineares obtidas com os resultados de tempo de exaustão são satisfatórias e significantes ($R^2=0,89\pm 0,08$), utilizando a linearização do modelo hiperbólico sugerido por Hill (1993). Billat et al. (2005) reportaram resultados similares em amostra composta por camundongos.

A V_{crit} de ratos sedentários foi obtida em $22,8\pm 0,7$ m/min. Billat et al. (2005) adaptaram o modelo de potência crítica para avaliação de camundongos em corrida e encontraram valores de V_{crit} compreendidos entre $17,8\pm 2,7$ e $24,1\pm 4,6$ m/min, com variações provenientes do gênero dos animais e características genéticas distintas. Essas diferenças entre estudo utilizando ratos Wistar e camundongos podem sugerir que os parâmetros do modelo de potência crítica são dependentes e sensíveis à espécie dos animais avaliados.

Para testar a velocidade crítica estimada por procedimento não-invasivo, os ratos Wistar foram submetidos ao método de máxima fase estável de lactato, considerado padrão ouro para avaliação aeróbia de humanos (Beneke, 1995, Beneke e Von Duvillard, 1996; Beneke et al., 2003; Billat et al., 2003) e ratos (Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2005). A figura 5.3 apresenta os resultados da cinética de lactato sanguíneo em três distintas velocidades (15, 20 e 25m/min). A mais alta intensidade na qual o aumento nas concentrações de lactato foi igual ou inferior à 1mmol/L do 10^o ao 25^o minuto de exercício foi considerada como equivalente à MFEL (Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2005). No presente estudo, a MFEL foi verificada em

20m/min, com concentrações de lactato sanguíneo de $3,84 \pm 0,31$ mmol/L. Esses resultados corroboram com nosso estudo prévio, no qual foi observada MFEL de ratos sedentários em similar intensidade (Manchado et al., 2005). De acordo com Pilis et al. (1992) e Langfort et al. (1996), o limiar anaeróbio de ratos determinado em teste incremental na esteira rolante ocorre em similar concentração lactacidêmica (4mmol/L).

Quando comparadas, foi observado que a intensidade de Vcrit superestimou em 10% a velocidade equivalente a MFEL. Em outros estudos realizados com humanos, resultados similares também foram obtidos. Pringle e Jones (2002) avaliaram um grupo de ciclistas e calcularam a potência de exercício associada ao limiar de fadiga, potência crítica e máxima fase estável de lactato. Os autores também observaram que a potência crítica foi 10% superior à MFEL.

Apesar dessa distinção de 10% observada no presente estudo, o modelo proposto parece ser apropriado para a avaliação aeróbia de ratos, já que houve elevada e significativa correlação entre Vcrit e MFEL ($r=0,81$). Entretanto, pequenos ajustes na Vcrit, em média 10%, devem ser considerados para prescrição de exercício aeróbio.

A capacidade de corrida anaeróbia também foi estimada com a utilização do procedimento não-invasivo. Essa possibilidade de determinação é outro importante aspecto do modelo escolhido. No presente estudo, a CCA foi $26,81 \pm 2,58$ m. Ao contrário da Vcrit, já bem estabelecida e validada como um parâmetro aeróbio (Housh et al., 1991; McLellan e Cheung, 1992; Hill et al., 2002), as respostas fisiológicas associadas à variável anaeróbia identificada pelo modelo ainda são questionáveis e de difícil entendimento. Alguns estudos têm encontrado correlação entre a capacidade de trabalho anaeróbio e outros índices, tais como déficit de oxigênio e máximo déficit de oxigênio acumulado (MAOD) (MAOD) (Hill e Smith, 1994) e teste de Wingate (Gullet et al., 1998). Por outro lado, Bulbulian et al. (1996) não observaram

correlação positiva entre CTA e teste de Wingate, em indivíduos de ambos os gêneros. Do mesmo modo, Dekerle et al. (2002) também não verificaram significativa correlação entre CTA e distância máxima anaeróbia executada por nadadores. Outros estudos, corroborando com os achados de Bulbulian et al. (1996) e Dakerle et al. (2002), não observaram tais correlações e questionaram a relevância fisiológica da CTA (Toussant et al., 1998; Soares et al., 2003). Mais investigações acerca do parâmetro anaeróbio estimado pelo modelo de potência crítica são necessárias, especialmente com o auxílio de pesquisas experimentais com animais.

É possível considerar que o protocolo não-invasivo testado pode ser utilizado como uma ferramenta para avaliação de ratos corredores, especialmente em modelos de fisiopatologia animal, tais como diabetes e obesidade.

Em resumo, os resultados do presente estudo sugerem que o modelo de potência crítica adaptado ao exercício de corrida em esteira rolante é adequado para avaliação aeróbia de ratos, mas a capacidade de corrida anaeróbia requer mais investigações.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 07070-5/2004), CAPES and CNPq (Proc. 300270/2004-16), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc**, v.27(6), p.863-867, 1995.
2. BENEKE, R.; VON DUVILLARD, S. Determination of maximal lactate steady state response in selected sports events. **Med Sci Sports Exerc**, v.28, p. 241-243, 1996.
3. BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v.89, p.95-9, 2003.
4. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v.33(6), p.407-26, 2003.
5. BILLAT, V. L.; MOUISEL, E.; ROBLOT, N.; MELKI, J. Inter- and intra-strain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol**, v.98(4), p.1258-63, 2005.
6. BISHOP, D.; JENKINS, D.G. The influence of recovery duration between periods of exercise on the critical power function. **Eur J Appl Physiol**, v.72, p.15-20, 1995.
7. BISHOP, D.; JENKING, D.G.; HOWARD, A. The critical power function is dependent on the duration of predictive exercise tests chosen. **Int J Sports Med**, v.19, p.125-129, 1998.
8. BULBULLIAN, R.; JEONG, J; MURPHY, M. Comparison of anaerobic components of the wingate and critical power tests in males and females. **Med Sci Sports Exerc**, v. 28(10), p.1336-1341, 1996.

9. CHASSAIN, A. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme á l'effort: application á la mesure des puissances de la fréquence cardiaque et de la lactatémie. **Science & Sports**, v.1, p.41-8, 1986.
10. DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP R G. Basic and clinical biostatistic. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.
11. DEKERLE, J.; SIDNEY, M.; HESPEL, M.J.; PELAYO, P. Validity and reliability of critical speed, critical stroke rate, and anaerobic capacity in relation to front crawl swimming performances. **Int J Sports Med**, v.23, p. 93-98, 2002.
12. DeVRIES, H.A.; MORITANI, T.; NAGATA, A.; MEGNUSSEN, K. The relation between critical power and neuromuscular fatigue as estimated from eletromyographic data. **Ergonomics**, v.25(8), p.783-791, 1982.
13. FERREIRA, J.C.B; ROLIM, N.P.L.; BATHOLOMEU, J.B.; GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P.C. Maximal lactate steady state in running mice: effects of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. Doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x, 2007.
14. GAESSER, G.A.; CARNEVALLE, T.J.; GARFUNKEL, A.; WLATER, D.O.; WOMACK, C.J. Estimation of critical power with nonlinear and linear models. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27(10), p.1430-1437, 1995.
15. GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C.Y.; MELLO, M.A.R. 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, p.725-6, 1991.
16. 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. **Comp Biochem Physiol**, v.130A, p.21-7, 2001.
17. GREEN, S.; DAWSON, B.T.; GOODMAN, C.; CAREY, M.F. Y-intercept of the maximal work-duration relationship and anaerobic capacity in cyclists. **Eur J Appl Physiol**, v.69, p.550-556, 1994.
18. GULLET, L.J.N.; HOUSH, T.J.; JOHNSON, G.O. A comparasion between methods of measuring anaerobic work capacity. **Ergonomics**, v.33(10), p.413-1419, 1998.
19. HILL, D.W. The critical power concept. **Int J Sports Med**, v.16, p. 237-254, 1993.
20. HILL, D.W.; SMITH, J.C. A method to ensure the accuracy of estimates of anaerobic capacity derived using the critical power concept. **J Sports Med Phys Fitness**, v.34, p.23-37, 1994.
21. HILL, D.W.; POOLE, D.; SMITH, J. The relationship between power and the time to achieve $VO_{2m\acute{a}x}$. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34(4), p.709-714, 2002.
22. HOUSH, J.D.; HOUSH, T.J.; BAUGE, S.M. A methodological consideration for the determination of critical power and anaerobic work capacity. **Research Quarterly For Exercise and Sport**, v.61, p.406-409, 1990.

23. HOUSH, T.J.; DeVRIES, H.A.; HOUSH, D.J.; TICHY, M.W.; SMITH, K.D.; TICHY, A.M.
The relationship between critical power and onset of blood lactate accumulation. **J Sports Med Phys Fitness**, v.31, p.31-36, 1991.
24. JENKINS, D.G.; QUIGLEY, B.M. Blood lactate in trained cyclists during cycle ergometry at critical power. **Eur J Appl Physiol**, v.61, p.278-283, 1990.
25. JENKINS, D.G.; QUIGLEY, B.M. The y-intercept of critical power function as a measure of anaerobic work capacity. **Ergonomics**, v.34, p.13-22, 1991.
26. JENKINS, D.G.; KRETEK, K.; BISHOP, D. The duration of predicting trials influences time to fatigue at critical power. **J Sci Sports Med**, v.1, p.213-218, 1998.
27. KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol**, v.42, p.25-34, 1979.
28. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.114 A, p.51-5, 1996.
29. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. **J Exerc Physiol online**, v.8, p.29-35, 2005.
30. MARANGON, L.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; KOKUBUN, E. Utilization of an hiperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc (Suppl)**, v. 34, p.149. 2002

31. McLELLAN, T.M.; CHEUNG, K.S.Y. A comparative evaluation of the individual anaerobic threshold and critical power. **Med Sci Sports Exerc**, v.24, p.543-550, 1992.
32. MONOD, H.; SCHERER J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics** v.8, p.329-38, 1965.
33. MORITANI, T.; NAGATA, A.; DeVRIES, H.A.; MURO, M. Critical power as a measure of physical work capacity and anaerobic threshold, **Ergonomics**, v.24, p.339-350, 1981.
34. MORTON, H.; BILLAT, V. The critical power model for intermittent exercise. **Eur J Appl Physiol**, v.91, p.303-307, 2004.
35. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106A, p.285-9. 1993.
36. PRINGLE, J.S.M.; JONES, A. M. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. **Eur J Appl Physiol**, v.88, p.214-226, 2002.
37. SJÖDIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int J Sports Med**, v.2, p.23-6, 1981
38. SOARES, S.; VILAR, S.; BERNARDO, C.; CAMPOS, A.; FERNADES, R.; VILLAS-BOAS, J.P. Using data from the critical velocity regression line for the estimation of anaerobic capacity in infant and adult swimmers. **Rev. Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.3, p.73-118, 2003.
39. STEGMANN, H.; KINDERMANN, W; SCHANABEL, A. Lactate Kinetics and individual anaerobic threshold. **Int J Sports Med**, v.2, p.160-165, 1981.

40. TEGTBUR, U.; BUSSE, M.W.; BRAUMANN, K. M. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v.25, p.620-7, 1993.
41. TOUSSAINT, H.M.; WAKAYOSHI, K.; HOLLANDER, P.A; OGITA, F. Simulated front crawl swimming performance related to critical speed and critical power. **Med Sci Sports Exerc**, v.30, p.144-151, 1998.
42. VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.
43. WAKAYOSHI, K.; ILKUTA, K.; YOSHIDA, T.; UDO, M.; HARADA, T.; MORITANI, T.; MUTOH, Y. et al. Determination and validity of critical velocity as an index of swimming performance in the competitive swimmer. *Eur J Appl Physiol*, v.64, p.153-157, 1992.
44. WASSERMAN, K.; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am J Cardiol**, V.14; P. 844-852, 1964.

ESTUDO 6

PROTOCOLO NÃO EXAUSTIVO DE DUPLOS ESFORÇOS PARA AVALIAÇÃO AERÓBIA DE RATOS CORREDORES

DOUBLE BOUTS TEST FOR NON-EXHAUSTIVE AEROBIC EVALUATION OF RUNNING RATS

Manchado, F.B.^{1,2}, Gobatto, C.A.¹; Contarteze, R.V.L.¹, Mello, M.A.R.¹

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil

2- Faculdades Integradas Einstein de Limeira- Fiel – Limeira – Brasil

Em análise no periódico “European Journal of Applied Physiology”

RESUMO

Por diversas e importantes razões, um elevado número de pesquisas vem sendo desenvolvido com animais de laboratório, especialmente com a utilização de ratos. Entretanto é necessário o desenvolvimento de métodos adequados para avaliação desses animais. O objetivo do presente estudo foi descrever um método de duplos esforços para avaliação aeróbia não exaustiva de ratos corredores (velocidade crítica), inicialmente sugerido por Chassain (1986), para humanos e posteriormente adaptado para ratos nadadores (Manchado et al., 2006). Treze ratos Wistar (120 dias) foram selecionados e adaptados ao exercício de corrida em esteira rolante por três semanas. Os ratos foram submetidos à quatro testes de duplos esforços em distintas velocidades (10, 15, 20 e 25m/min), executados de maneira randômica e com intervalos de 48 horas entre eles. Os ratos executaram duplos esforços com duração de 5 minutos em mesma intensidade, separados por uma recuperação passiva de 2 minutos. Amostras de sangue foram retiradas da extremidade distal da cauda dos ratos no final de cada esforço para determinação do lactato sanguíneo. Para cada intensidade, foram calculados os valores de delta lactato, subtraindo a concentração do final do primeiro esforço (LAC_{E1}) da concentração lactacidêmica obtida ao final do segundo esforço (LAC_{E2}). Com os deltas lactato para cada velocidade, foi plotada uma interpolação linear, possibilitando a determinação do “delta de lactato nulo” individual, equivalente à velocidade crítica (V_{Crit}). Para verificar a estabilização lactacidêmica na intensidade de V_{crit} , os ratos foram submetidos a 25 minutos de exercício contínuo nas velocidades 15, 20 e 25m/min, com coletas de sangue a cada 5 minutos. A V_{crit} estimada foi $16,6 \pm 0,7$ m/min, com regressões lineares significantes ($R=0,90 \pm 0,03$). Os animais apresentaram máxima fase estável de lactato a concentração de lactato de $3,90 \pm 0,35$ mmol/L, em velocidade equivalente à 20m/min. Na intensidade de 15m/min, houve estabilização lactacidêmica em concentração média inferior ($3,05 \pm 0,34$ mmol/L). Houve um aumento progressivo do lactato na intensidade 25m/min. A V_{crit} e MFEL apresentaram correlação significativa ($r=0,78$). Os resultados sugerem que o protocolo não exaustivo de duplos esforços parece ser válido para avaliação de ratos corredores sedentários, mas esse método subestima em 20% a MFEL.

Palavras-chave: avaliação aeróbia, procedimento não exaustivo, ratos corredores

ABSTRACT

For obvious reasons, a large number of studies involving exercise are conducted in laboratory animals, mainly rats. Therefore, it is necessary to develop adequate methods for physical evaluation of exercised rats. The aim of the present study was to describe a double bouts exercise method for non-exhaustive aerobic conditioning determination in running rats (critical velocity), based on the protocol originally described by Chassain (1986), for human beings and adapted for swimming rats (Manchado et al., 2006). Thirteen male Wistar rats (120 days old) were selected and adapted to treadmill running for three weeks. The rats were submitted to four running tests at different velocities (10, 15, 20 and 25m/min) executed at random, and with intervals of 48 hours among them. The rats run twice for 5 minutes each time, at same intensity, with a 2 minutes interval between the two exercise bouts. Blood samples were collected from the animals at the end of each bout for lactate determination. For each intensity, it was calculated the value of delta lactate, by subtracting the blood lactate concentration at the end of the first bout (LAC_{E1}) from the lactate concentration at the end of the second bout (LAC_{E2}). With the delta lactate for each velocity, an individual linear interpolation was plotted, which enabled the calculation of a “null delta lactate”, equivalent to the critical velocity (CV). To verify the stabilization of the blood lactate at intensity of CV, the rats were submitted to 25 minutes of continuous exercise at 15, 20 and 25m/min velocities, with blood collection every 5 minutes. The estimated CV was 16.6 ± 0.7 m/min, with significant linear regressions ($R=0.90\pm 0.03$). The animals presented maximal lactate steady state at 3.90 ± 0.35 mmol/L of blood lactate, at the velocity of 20m/min. At 15m/min, the blood lactate also stabilized, but in lower concentration (3.05 ± 0.34 mmol/L). There was a progressive increase in blood lactate concentration at 25m/min. The CV and MLSS presented significant correlation ($r=0.78$). The results suggest that the non-exhaustive protocol used seems to be valid for the aerobic evaluation in sedentary running rats, but this protocol underestimates the MLSS in 20%.

Key-words: aerobic evaluation, non-exhaustive procedure, running rats

INTRODUÇÃO

O termo limiar anaeróbio foi inicialmente sugerido por Kinderman et al. (1979), que estudando a transição energética entre o sistema aeróbio anaeróbio, observaram a mudança da predominância entre os metabolismos quando a concentração sanguínea de lactato encontrava-se entre 2,0 e 4,0mmol/L, relatando ainda a existência de um limiar aeróbio em concentração próxima a 2,0mmol/L e limiar anaeróbio próxima ao valor 4,0mmol/L de lactato. Em humanos, essa intensidade pode ser determinada submetendo o indivíduo avaliado à esforços com cargas progressivas e verificação do comportamento lactacidêmico durante o teste incremental. Teoricamente, o LAn indica a intensidade equivalente à máxima fase estável de lactato (MFEL) ou a mais alta carga na qual a concentração de lactato sanguíneo apresenta um aumento igual ou inferior à 1mM, do 10º ao 30º minuto de exercício, em esforço constante (Heck et al., 1985, Beneke, 2003).

Um protocolo não exaustivo de duplos esforços para a avaliação aeróbia de indivíduos avaliados em cicloergômetro foi sugerido na década de 80, por Chassain (1986). Esse método foi baseado nas respostas de frequência cardíaca, consumo de oxigênio e lactacidemia sanguínea frente a dois esforços em mesma intensidade, separados por uma recuperação passiva. O embasamento teórico da proposta de Chassain assume que a transição metabólica aeróbia-anaeróbia é demarcada pela mais elevada intensidade de esforço na qual as variáveis fisiológicas não apresentam aumento durante carga constante, i.e., a máxima fase estável de lactato sanguíneo, FC e VO_2 . Esse método consiste em submeter os indivíduos à dois exercícios em igual intensidade com duração de 3 minutos, separados por uma recuperação passiva de 1,5 minuto. Para cada esforço, os deltas lactado, FC e VO_2 são calculados subtraindo os valores obtidos para essas variáveis ao final do primeiro esforço, dos encontrados ao final do segundo

esforço. Uma interpolação individual é plotada com os valores deltas lactato, FC e VO_2 encontrados em cada carga, determinando assim a intensidade equivalente ao “delta nulo”, ou y-intercepto da interpolação linear. Segundo Chassain (1986), a intensidade associada ao “delta nulo” indica, ao menos teoricamente, a máxima fase estável para cada variável fisiológica analisada, sendo então também denominada “potência crítica”.

Por existirem limitações em estudos realizados com humanos, modelos animais são utilizados como uma importante ferramenta para áreas relacionadas à saúde, tais como a fisiologia do exercício.

Para minimizar possíveis equívocos na prescrição de esforços à ratos, existe um grande interesse dessas áreas de pesquisa em identificar, com precisão, a intensidade de exercício. Apenas com essa cautela, é possível a transferência de conhecimentos associados ao exercício animal, para respostas fisiológicas apresentadas por humanos. Testes físicos aplicados à ratos podem suplementar informações acerca dos efeitos benéficos e/ou deletérios do exercício, quando aplicado à grupos com ou sem alterações metabólicas. Nesse sentido, utilizando ratos exercitados é possível um acompanhamento das respostas fisiológicas frente à intensidades conhecidas através de análises celulares e moleculares.

Recentemente, nosso grupo conduziu um estudo que objetivo adaptar o protocolo de Chassain para avaliação aeróbia de ratos exercitados por natação (Manchado et al., 2006). Foi demonstrada a possibilidade de adaptação desse método para determinação da condição aeróbia de ratos, bem como sua correlação com a máxima fase estável de lactato durante o exercício de natação para a amostra analisada.

A corrida em esteira rolante também é um importante tipo de exercício muito utilizado quando utiliza-se ratos (Daggan et al., 2000, Bennel et al., 2002, Carvalho et al., 2005). Pilis et

al. (1993) analisou a resposta lactacidêmica de ratos submetidos à um protocolo com cargas progressivas, executado em esteira rolante, e determinou o limiar anaeróbio de ratos corredores (LAn). Nesse estudo, a concentração de lactato sanguíneo comportou-se de maneira similar à descrita em mesmo protocolo aplicado à humanos. O LAn foi observado à velocidade de 25 m/min, em concentração média de lactato equivalente à 4,0 mmol/L.

Também recentemente, Manchado et al. (2005) determinaram a máxima fase estável de lactato de ratos corredores, a partir de exercícios contínuos com coletas de sangue a cada 5 minutos para determinação do lactato sanguíneo. A velocidade associada à MFEL para ratos corredores foi 20 m/min, em concentração média de estabilização lactacidêmica à 3,9 mmol/L. Resultados similares foram observados por Contarteze et al. (in press). Billat et al. (2005) também verificou a velocidade crítica de camundongos em esteira rolante, porém com a utilização do modelo não invasivo, mas exaustivo, inicialmente sugerido por Monod e Scherer (1965) para avaliação humana. Apesar da importância desses experimentos, grande parte dos modelos de avaliação executáveis em ratos corredores utiliza procedimentos exaustivos, o que compromete a aplicabilidade dos mesmos.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi descrever o método não exaustivo de duplos esforços para avaliação da condição aeróbia de ratos em exercício de corrida em esteira rolante, baseado no protocolo originalmente sugerido por Chassain (1986), para humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Treze ratos Wistar não treinados e adultos (120 dias), pesando 310-390g no início e 410-480g ao final do experimento foram utilizados. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno (5 ratos por gaiola), em biotério com ciclo claro escuro normal (12/12 horas) à temperatura 25°C. A alimentação dos ratos consistiu de ração Labina-Purina para roedores e água *ad libitum*.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas éticas propostas pelo Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) para experimento com animais.

Seleção dos ratos corredores e adaptação ao exercício de corrida em esteira rolante

O processo de seleção dos ratos corredores ocorreu em dez dias consecutivos, com os animais correndo a 15m/min, por cinco minutos. Foram selecionados para compor a amostra os ratos que apresentaram resposta positiva ao estímulo por nove ou dez vezes. Posteriormente, os animais selecionados foram adaptados ao exercício de corrida em esteira rolante. A adaptação consistiu na execução de corrida por três semanas, 5 dias/semana, com duração e velocidade sendo progressivamente aumentadas. A proposta da adaptação foi a redução do estresse dos animais frente ao exercício sem promoção de adaptações fisiológicas advindas do treinamento físico.

Protocolo Experimental

Método de duplos esforços

Os ratos foram individualmente submetidos à 4 testes de corrida em distintas velocidades (10, 15, 20 e 25m/min), executados de maneira randômica e com intervalo de 48 horas entre eles.

As velocidades supracitadas foram selecionadas com base em estudos prévios realizados em nosso laboratório, nos quais observamos a máxima fase estável de lactato em intensidade correspondente à 20m/min (Manchado et al., 2005, Manchado et al., 2006, Contarteze et al., 2007). Dessa maneira, foram escolhidas velocidades teoricamente superiores e inferiores à MFEL. O método de duplos esforços proposto por Chassain (1986) é caracterizado pela execução de duplos esforços de exercício em mesma intensidade, separados por uma recuperação passiva. No presente estudo, os ratos foram submetidos à 5 minutos de corrida em cada esforço, espaçados por 2 minutos de intervalo. Amostras sanguíneas foram extraídas da cauda dos roedores ao final de cada esforço para a determinação do lactato sanguíneo (Figura 6.1). Para cada intensidade foi obtido o valor de delta lactato subtraindo o valor lactacidêmico ao final do primeiro esforço (LAC_{E1}) da concentração lactacidêmica ao final do segundo esforço (LAC_{E2}). Dessa forma, a equação utilizada para a obtenção dos deltas foi $\Delta LAC = LAC_{E2} - LAC_{E1}$. Com o delta lactato para cada velocidade, foi plotado um gráfico individual de interpolação linear com o objetivo de calcular o “delta lactato nulo”, equivalente à velocidade crítica (V_{crit}) sugerida pelo método Chassain (1986). (Figura 6.2).

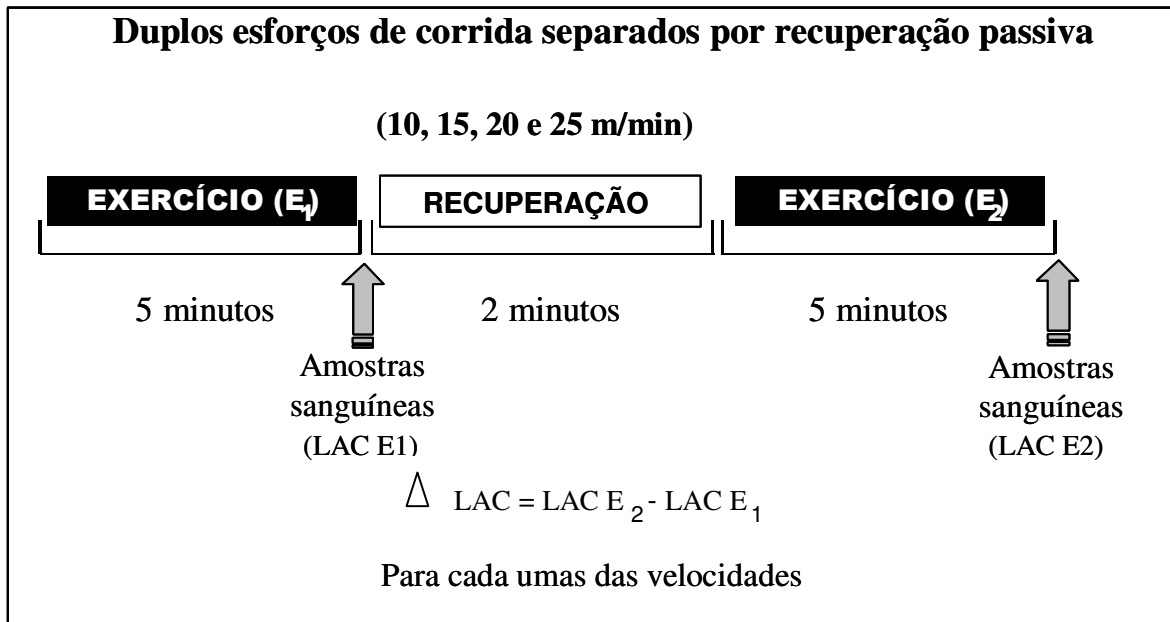


Figura 6.1. Protocolo experimental utilizado no presente estudo com ratos corredores, baseado no método Chassain (1986).

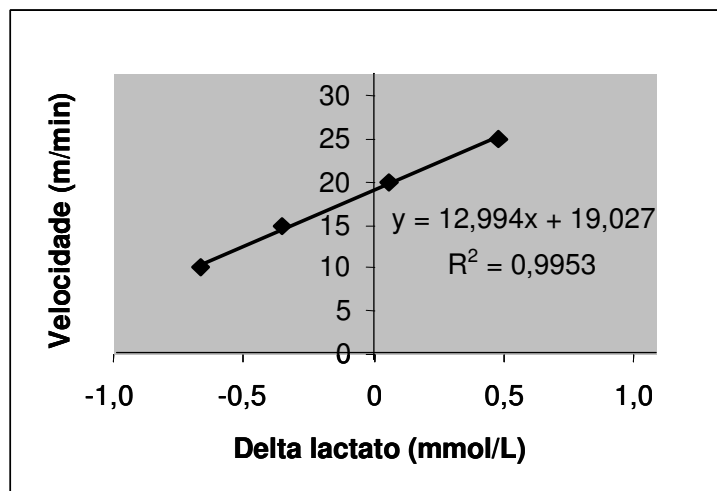


Figura 6.2. Representação gráfica da interpolação linear obtida para a amostra analisada. A velocidade crítica (V_{crit}) obtida por procedimento de deltas lactato é equivalente ao y-intecepto da reta de regressão.

Determinação da máxima fase estável de lactato

Para verificar a estabilização das concentrações de lactato sanguíneo em intensidade entendida como Vcrit determinada pelo método utilizado, os ratos foram submetidos à 25 minutos de corrida em três distintas velocidades (15, 20 e 25m/min), também distribuídas randomicamente e com intervalo de 48 horas entre elas. A mais alta intensidade na qual o aumento lactacidêmico foi igual ou inferior à 1mmol/L entre o 10^o e 25^o minuto de esforço foi interpretada como equivalente à máxima fase estável de lactato (Gobatto et al., 2001, Manchado et al., 2005, Manchado et al., 2006, Contarteze et al., 2007).

Extração de amostras sanguíneas e análise

Amostras de sangue (25µl) foram extraídas da extremidade distal da cauda dos ratos durante o protocolo experimental e depositado em tubos Eppendorf (capacidade de 1.5ml) contendo 50µl de fluoreto de sódio à 1%. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas em lactímetro YSI, modelo 1500 SPORT.

Análise Estatística

O procedimento estatístico consistiu na aplicação de uma ANOVA One Way, precedida, quando necessário, por teste post-hoc Newman-Keuls (Dawson-Saunders e Trapp, 1994). Em todos os casos, utilizou-se o pacote Statistica 6.0 e o nível de significância foi pré-fixado em 5%.

RESULTADOS

Todos os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

Houve um aumento linear nos valores de delta lactato de acordo com os incrementos de velocidade. A velocidade crítica estimada pelo método adotado foi equivalente à $16,6 \pm 0,7$ m/min, com regressões lineares significantes ($R=0,90 \pm 0,03$) (Tabela 6.1). A figura 6.3 expressa graficamente o resultado geral do procedimento de Chassain para a amostra analisada.

A concentração sanguínea na máxima fase estável de lactato foi $3,90 \pm 0,35$ mmol/L, observada em intensidade equivalente à 20m/min. Na velocidade 15m/min, houve estabilização do lactato sanguíneo, porém em concentração inferior ($3,05 \pm 0,34$ mmol/L). Um progressivo aumento nos valores de lactato foi observado com os ratos correndo na velocidade 25m/min, e 67% da amostra atingiu a exaustão entre o 10^o e 25^o minuto de exercício (Figura 6.3).

Tabela 6.1. Concentrações de lactato sanguíneo durante testes de esforços em intensidades correspondente à 15, 20 e 25m/min (n=13). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

Rato	DELTA LACTATO				Vcrit (m/min)	R
	10 (m/min)	15 (m/min)	20 (m/min)	25 (m/min)		
1	-0,21	-0,06	-0,06	0,21	18,53	0,93
2	-0,69	-0,27	0,33	0,60	17,58	0,99
3	-0,72	-0,03	0,93	1,23	15,00	0,98
4	-0,54	1,05	0,63	1,08	13,92	0,75
5	-0,99	-0,48	-0,24	1,62	17,62	0,92
6	-0,82	-0,72	0,21	0,23	20,35	0,92
7	-0,66	-0,35	0,06	0,48	19,03	1,00
8	-0,18	0,33	0,63	0,90	11,72	0,98
9	-0,15	-0,51	-0,44	0,66	18,30	0,60
10	-0,60	-0,09	-0,17	0,67	18,03	0,91
11	-0,40	0,45	0,51	1,20	13,35	0,96
12	-0,70	-0,66	-0,67	1,82	17,71	0,78
13	-0,06	-0,01	0,24	1,49	14,31	0,92
Média	-0,52	-0,10	0,15	0,94	16,57	0,90
EPM	0,08	0,14	0,13	0,14	0,72	0,03

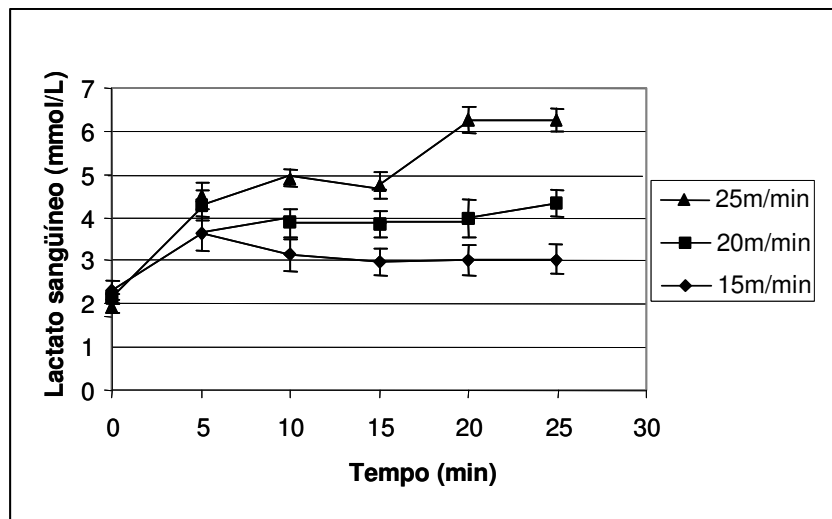


Figura 6.3. Máxima fase estável de lactato obtida em corrida (n=13). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média.

DISCUSSÃO

A fisiologia do exercício tem utilizado demasiadamente modelos de experimentação animal para observar respostas fisiológicas frente à diferentes esforços, especialmente no caso da necessidade de manipulações invasivas e estudos com doenças que acometem a população humana. Entretanto, poucas pesquisas são desenhadas para avaliar e quantificar a intensidade de esforço executada por animais durante a atividade física (Billat et al., 2005; Gobatto et al., 1991; Gobatto et al., 2001; Gobatto et al., 2005; Langfort et al., 1996; Manchado et al., 2005; Marangon et al., 2002; Pilis et al., 1993; Voltarelli et al., 2002). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de métodos simples para avaliação física de ratos de laboratório.

O presente estudo descreveu a adaptação do protocolo não exaustivo de potência crítica inicialmente sugerido para humanos (Chassain, 1986), para avaliação aeróbia de ratos corredores.

De acordo com a tabela 1, todos os ratos apresentaram valores aceitáveis e esperados de delta lactato, elevando de maneira progressiva com o aumento da intensidade dos duplos esforços. Resultados similares foram observados no protocolo não exaustivo de duplos esforços adaptado à avaliação de ratos submetidos ao exercício de natação.

Em relação à razão esforço-pausa adotada no presente estudo, houve similaridade da executada por ratos nadadores em estudo prévio (Manchado et al., 2006a) e conseqüentemente diferente da proposta por Chassain (1986), que utilizou duas sessões de exercício em igual intensidade, com duração de três minutos, separadas por uma recuperação passiva composta por 1,5 minutos entre os esforços. Protocolos para avaliação de ratos submetidos à natação e corrida em esteira rolante usualmente aplicam estágios de 5 minutos para avaliação lactacidêmica acima dos valores basais (Gobatto et al., 1991; Voltarelli et al., 2002; Prada et al., 2004; Manchado et

al., 2005). Por essa razão, novamente utilizamos 3 minutos de duplos esforços, intercalados por uma recuperação passiva de dois minutos, resultando na razão esforço-pausa similar à descrita por Chassain (1986).

A grande vantagem do protocolo de avaliação adotado encontra-se na característica não invasiva do procedimento, bem como na individualização dos resultados. Grande parte dos métodos indicados à determinação da intensidade de esforço à qual ratos são submetidos é composta por necessidade de exercícios exaustivos (Billat et al., 2005; Gobatto et al., 1991; Gobatto et al., 2005; Langfort et al., 1996; Marangon et al., 2002; Pilis et al., 1993; Prada et al., 2004; Voltarelli et al., 2002), resultando na redução da aplicabilidade de tais testes físicos, haja vista a impossibilidade de execução do teste com animais acometidos por doenças crônicas diversas.

A máxima fase estável de lactato durante 25 minutos de exercício contínuo foi utilizada para validar a metodologia proposta, já que é considerada a mais alta intensidade de esforço na qual a produção e liberação de lactato no sangue são compensadas pela remoção desse metabólito (Billat et al., 2003; Mader e Heck, 1986; Pringle e Jones, 2002). Além disso, o protocolo de MFEL vem sendo considerado “padrão ouro” para determinação da intensidade de transição de predominância metabólica aeróbia/anaeróbia (Beneke, 1995; Beneke, 2003; Billat et al., 2003; Gobatto et al., 2001, Manchado et al., 2005, Ferreira et al., 2007).

No presente estudo, a MFEL foi obtida em intensidade correspondente à 80% da velocidade crítica, com os animais correndo a 20m/min (concentração de lactato= $3,90 \pm 0,03$ mmol/L). Desse modo, o protocolo não exaustivo superestimou em 20% a velocidade de MFEL, também interpretada como transição aeróbia/anaeróbia de ratos corredores sedentários.

Outros estudos realizados por nosso grupo obtiveram resultados em mesma direção, tanto em relação à intensidade associada à MFEL, quanto à concentração lactacidêmica nessa carga.

Manchado et al. (2005) submeteram ratos sedentários à corrida contínua em 10, 15, 20, 25 e 30m/min. A MFEL foi obtida a concentração $3,9 \pm 1,1$ mmol/L e velocidade 20m/min. Em ambos os estudos, o valor da máxima intensidade de exercício associada à condição aeróbia foi inferior à descrita por Pilis et al. (1993) (25 m/min), em teste distinto. Esses autores determinaram o limiar anaeróbio (LAn) de ratos corredores em teste progressivo de multiestágios. O LAn foi estimado por gráficos individuais das concentrações de lactato sanguíneo vs. velocidade, sendo considerado como equivalente à intensidade na qual a lactacidemia indica um aumento desproporcional em relação à elevação da carga de esforço. Langfort et al. (1996) também reportaram mesma intensidade de LAn para ratos sedentários (25m/min), calculada de maneira similar à proposta por Pilis et al. (1993), porém com o auxílio de bissegmentação da reta de regressão individual.

As diferenças nas concentrações de lactato sanguíneo e intensidade associada à MFEL sugere a protocolo-dependência dos métodos adaptados à ratos (Manchado et al. 2006), assim como já descrito para humanos (Jones e Doust, 1998) e protocolos para ratos (Manchado et al., 2006b).

Mais investigações referentes à protocolos de avaliação para ratos são necessárias devido a importância da intensidade de esforço nas alterações de respostas fisiológicas. Nós acreditamos que o teste não exaustivo apresenta extremo significado para avaliação de ambos, humanos e animais, comprometidos por doenças endócrino-metabólicas, com condição física debilitada. Ainda cabe ressaltarmos que o procedimento proposto no presente estudo fornece resultados individuais, o que fortalece a aplicação de treinamentos peculiares e individualizados com base nas informações obtidas no teste. Como sugestões para futuros estudos, acreditamos na real aplicação do método à animais com objetivo de verificar sua sensibilidade ao treinamento, em ratos saudáveis ou não, bem como efeitos de dieta e ritmo circadiano nos parâmetros obtidos.

Em resumo, o conjunto de resultados sugere que o protocolo não exaustivo de duplos esforços utilizado no presente estudo, parece ser válido para avaliação aeróbia de ratos sedentários, submetidos ao exercício de corrida em estira rolante, mesmo superestimando em 20% a intensidade equivalente à MFEL. Essa determinação é viável devido à sistematização dos dados, porém pequenos ajustes na intensidade de esforço são necessários durante a execução de treinamento de corrida para ratos.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi suportado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP – Proc. 04/07070-5). Dessa maneira, agradecemos o apoio financeiro fornecido pela instituição. Também declaramos nossos agradecimentos ao auxílio técnico de Clarice Yoshiko Sibuya, Eduardo Custódio e José Roberto Rodrigues da Silva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc**, v.27(6), p.863-867, 1995.
2. BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v.89, p.95-99, 2003.
3. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v.33, p.407-426, 2003.

4. BILLAT, V.L.; MOUISEL, E; ROBLOT, N.; MELKI, J. Inter- and intra-strain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol**, v.98, p.1258-1263, 2005.
5. BENNEL, K.L.; KHAN, K.M.; WARMINGTON, S.; FORWOOD, M. R.; COLEMAN, B.D.; BENNETT, M.B.; WARK, J.D. Age does not influence the bone response to treadmill exercise in female rats. **Med Sci Sports Exerc.** v.34, p.1958-65, 2002.
6. CARVALHO, J.F.; MASUDA, M.O.; POMPEU, F.A. Methods for diagnosis and control of aerobic training in rats based in lactate threshold. **Comp Biochem Physiol part A.**, v.140(4), p.409-13, 2005.
7. CHASSAIN, A. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme á l'effort: application á la mesure des puissances de la frequence cardiaque et de la lactatémie. **Science & Sports**, v.1, p.41- 48, 1986.
8. CONTARTEZE, RV.L.; MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comp Biochem Physiol part A** (in press) 2007.
9. DAGGAN, R. N., ZAFEIRIDIS, A., DIPLA, K., PUGLIA, C. D., GRATZ, I., CATALANO, E., KENDRICK, Z. V., 2000. The effects of chronic exercise on anesthesia induced hepatotoxicity. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.2024-8, 2000.
10. DAWSON-SAUNDERS, B., TRAPP, R.G. Basic and clinical biostatistic. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut., 344, 1994.

11. FERREIRA JCB, ROLIM NPL, BARTHOLOMEU JB, GOBATTO CA, KOKUBUN E, BRUM PC. Maximal lactate steady state in running mice: effects of exercise training. **Clin Experim Pharmacol Physiol**. Doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x, 2007.
12. GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C.Y.; MELLO, M.A.R.. 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, p. 725-726, 1991.
13. 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. **Comp Biochem Physiol**, v.130 A, p.21-27, 2001.
14. GOBATTO, C.A.; MANCHADO, F.B.; VOLTARELLI, F.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; MELLO, M.A.R. Non-invasive critical load determination in swimming rats: effects of muscle glycogen depletion. **Med Sci Sports Exerc**. (Suppl), v.37, p. S331, 2005.
15. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. **Int J Sports Med**, v.6, p.117-130, 1985.
16. JONES, A.M.; DOUSTY, J.H. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8Km running performance. **Med Sci. Sports Exerc**, v.30, p.1304-1313, 1998.
17. KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl. Physiol**, v. 42, p. 25-34, 1979.

18. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.114 A, p.51-55, 1996.
19. MADER, A.; HECK, H.. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int J Sports Med**, v.7, p.45-65, 1986.
20. MANCHADO, F.B., GOBATTO, C.A., CONTARTEZE, R.V.L, PAPOTI, M., E MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. **J Exerc Physiol online**, v.8, p.29-35, 2005.
21. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Máxima fase estável é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12(5), p.259-262, 2006.
22. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.31, p.731-736, 2006b.
23. MARANGON, L.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; KOKUBUN, E. Utilization of an hiperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc** (Suppl), v.34, p.149, 2002.
24. MONOD, H.; SCHERER, J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics**, v.8, p.329-338, 1965.

25. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106 A, p.285-289, 1993.
26. PRADA, F.J.P.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.A.M; GOBATTO, C.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao LAn. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. v.12, p.29-34, 2004.
27. PRINGLE, J.S.M.; JONES, A.M.. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. **Eur J Appl Physiol**, v.88, p.214-226, 2002.
28. VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.

ESTUDO 7

EFEITO DO CICLO CLARO-ESCURO NA DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE CRÍTICA E CAPACIDADE DE CORRIDA ANAERÓBIA DE RATOS WISTAR

EFFECTS OF LIGHT-DARK CYCLE ON CRITICAL VELOCITY AND ANAEROBIC CAPACITY DETERMINATION IN RUNNING WISTAR RATS

Fúlvia de Barros Manchado^{1,2}, Clécia Soares de Alencar Mota¹, Carla Ribeiro¹, Gustavo Gomes de Araujo¹, Michel Barbosa Araújo¹, Ricardo Vinícius Ledesma Contarteze¹, Claudio Alexandre Gobatto¹, Maria Alice Rostom de Mello¹

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP , Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil

2- Faculdades Integradas Einstein de Limeira- Fiel, Limeira – São Paulo - Brasil

Submetido ao periódico “Physiology and Behavior”

RESUMO

Um dos protocolos utilizados em nosso Laboratório para avaliação de ratos em natação e corrida em esteira rolante é o modelo de não invasivo de potência crítica. Os ratos Wistar são caracteristicamente noturnos, porém grande parte dos procedimentos experimentais executados com essa linhagem ocorre no período diurno, não respeitando seu ritmo circadiano. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do ciclo claro-escuro na determinação da velocidade crítica (V_{crit}) e capacidade de corrida anaeróbia (CCA) de ratos corredores. Para isso, todo o procedimento experimental foi realizado com dois grupos separados aleatoriamente, em duas distintas condições de luminosidade: ciclo claro-escuro de 12/12 horas com luzes acesas das 6:00 às 18:00hs (grupo ciclo normal CN) e ciclo claro-escuro 12/12 horas com luzes acesas das 18:00 à 6:00hs (grupo ciclo CI). Inicialmente houve um processo de seleção e adaptação dos ratos à esteira rolante, sendo essa etapa já realizada nos respectivos ciclos. O protocolo para determinação de V_{crit} e CCA consistiu de 4 esforços exaustivos em velocidades aleatórias equivalentes a 25, 30, 35 e 40m/min, separadas por intervalo de 48 horas. Houve registro do tempo de exaustão em cada intensidade (t_{lim}). A V_{crit} e CCA foram estimadas utilizando o ajuste linear velocidade versus $1/t_{lim}$, no qual a V_{crit} corresponde ao y-intercepto e a CCA, à inclinação da reta de regressão. Para comparação dos parâmetros aeróbio e anaeróbio obtidos em ciclo normal e ciclo invertido, um teste t-Student para medidas independentes foi utilizado, com nível de significância pré-fixado em 5%. A seleção dos ratos corredores revelou uma significativa influência do ciclo (16,4% e 28,9% de ratos caracterizados como corredores, em CN e CI, respectivamente). Houve distinção da V_{crit} determinada nas duas diferentes condições de luminosidade, sendo esta superior no ciclo claro-escuro invertido ($V_{crit\ CN} = 22,7 \pm 0,7$ m/min e $V_{crit\ CI} = 25,5 \pm 0,4$ m/min). Não foi observado efeito do ciclo na capacidade de corrida anaeróbia ($CCA_{CN} = 22,8 \pm 2,8$ m; $CCA_{CI} = 21,8 \pm 4,9$ m) e no ajuste matemático de regressão linear ($R^2_{CN} = 0,88 \pm 0,03$ e $R^2_{CI} = 0,85 \pm 0,02$). De acordo com os resultados é possível concluir que há a necessidade de cautela com o ritmo circadiano de roedores na prescrição de exercício em esteira rolante, especialmente devido à condição aeróbia ser melhorada quando o ciclo claro-escuro invertido é utilizado.

Palavras-chave: ciclo claro escuro, capacidade aeróbia, capacidade anaeróbia.

ABSTRACT

The aerobic and anaerobic parameters are very important for exercise prescription of sedentary and trained rats. The non-invasive critical power model suggested for aerobic/anaerobic evaluation of human beings was adapted for swimming and running rats in our Laboratory. The Wistar rats are nocturnal animals, however the great number of experiments executed with these mammals occurs in the daylight. Therefore, the aim of the present study was to verify the effect of the light-dark cycle on the critical velocity (CV) and anaerobic capacity (ARC) determination of running rats. For this, all the experimental procedure was carried through with two separate groups, in two conditions: regular light-dark cycle 12/12 hours (light on room 6.00am to 6.00pm hours - RC group), with rats evaluated in light phase and altered light-dark cycle 12/12 hours (light on room 6.00pm to 6.00am hours - AC group) with rats evaluated in dark phase. Initially running rats were selected and adapted to treadmill running. After they were familiarized with treadmill running, the rats were submitted to four exercise tests at 25, 30, 35 and 40m/min performed random and continuously until exhaustion, for the CV and ARC estimations. The hyperbolic curve velocity versus time to exhaustion was linearized to $V = CV + ARC/t_{lim}$, where the CV and ARC were the linear and slope coefficients, respectively. For comparison of the aerobic and anaerobic parameters obtained in the regular cycle and the altered cycle, a test t-Student for independent measures was used, with $p < 0.05$. The running rats selection showed a significant difference in two cycles (16.4% and 28.9% of running rats, in RC and IC, respectively). The CV was highest in AC (CV RC = 22.7 ± 0.7 m/min and CV AC = 25.5 ± 0.4 m/min), but the ARC was not different in both luminosity conditions (ARC RC = 22.8 ± 2.8 m and ARC AC = 21.8 ± 4.9 m). These results indicate that the caution with the circadian rhythm of rats submitted to running exercise is necessary, especially due to the fact that aerobic condition is improved when the altered light-dark cycle is used.

Key-words: light-dark cycle, aerobic capacity, anaerobic capacity, running rats.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de experimentação animal associada à utilização de exercício apresenta extrema importância para diversas áreas da saúde, haja vista a aplicação da atividade física como prevenção e tratamento de doenças crônicas, bem como devido à possibilidade de execução de procedimentos com característica invasiva.

Apesar da vasta utilização de roedores exercitados, assim como observa-se em humanos há a necessidade do controle da intensidade, volume e frequência do treinamento aplicado à esses animais. Nesse sentido, diversos estudos vêm adaptando e padronizando protocolos de avaliação física para ratos (Pilis et al., 1993, Langfort et al., 1996, Gobatto et al., 2001, Voltarelli et al., 2002) e camundongos (Ferreira et al., 2007, Billat et al., 2005) submetidos a exercício em distintos ergômetros, facilitando e potencializando a prescrição de esforços para tais mamíferos (Oliveira et al., 2005, Braga et al., 2004).

Há algumas décadas, Monod e Scherrer (1965) propuseram um método não invasivo baseado na relação potência de esforço e tempo máximo de realização do exercício associado à potência, para avaliação aeróbia e anaeróbia de humanos executando exercícios monoarticulares. De acordo com a teoria, o modelo matemático hiperbólico da relação entre potência de exercício e seu respectivo tempo de exaustão fornece dois parâmetros interessantes: a potência crítica (P_{crit}), representando a máxima intensidade de exercício suportável por um longo período temporal; e a capacidade de trabalho anaeróbio (CTA), comumente interpretada como um estoque energético utilizado em momentos de atividade anaeróbia.

Devido ao reduzido custo financeiro, facilidade na aplicação do procedimento e correlação dos parâmetros obtidos por esse teste com variáveis determinadas por técnicas invasivas (Hill, 1993, Morton, 2006), esse método foi adaptado para diversos tipos de exercício e

populações com níveis de treinamento distintos (Jenkins e Quigley, 1998, Morton e Billat, 2004, Berthoin et al., 2006, Vanhatalo et al., 2007, Brickley et al., 2007). Cabe ressaltar que a única desvantagem salutar do modelo é a necessidade de esforços até a exaustão para obtenção da potência crítica e a capacidade de trabalho anaeróbio.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa visualizou na proposta inicial de Monod e Scherrer (1965) uma potencial possibilidade de utilização do modelo para avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos Wistar exercitados, adaptando o protocolo à exercício de natação e corrida em esteira rolante para esses animais (Marangon et al., 2002, Gobatto et al., 2005, Manchado et al., 2006a).

Muitas metodologias associando atividade física com roedores são realizadas em período diurno ou de claridade no laboratório de experimentação animal. Paradoxalmente, os ratos Wistar, especialmente, são caracteristicamente noturnos e a luminosidade ou ciclo claro-escuro são citados na literatura como um dos principais fatores externos moduladores de respostas comportamentais, hormonais e motoras de mamíferos (Mrosovsky, 1996, Reffinetti, 2006). Apesar disso, são escassos na literatura estudos preocupados em verificar os efeitos do ciclo de luminosidade nas respostas fisiológicas de ratos exercitados.

Em conforme com o ritmo circadiano, a execução da atividade física em momento de claridade é concomitante à preparação orgânica dos ratos Wistar para sono, podendo ser observadas nesse período respostas fisiológicas distintas como a redução da atividade simpática e conseqüente diminuição de frequência cardíaca e pressão arterial (Van den Buuse, 1999), redução da razão metabólica basal em até 30%, diminuição do tônus muscular, atividade de diversos hormônios, tais como glucagon, testosterona, aldosterona e hormônio do crescimento,

além de alteração na síntese e distribuição de substâncias importantes para o mecanismo sono-vigília como a serotonina e a melatonina (Liu e Borjigin, 2006).

Com base nas informações acerca da importância do ritmo circadiano para as atividades desenvolvidas por mamíferos, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do ciclo claro-escuro na determinação da velocidade crítica (V_{crit}) e capacidade de corrida anaeróbia (CCA) de ratos corredores.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a política do Colégio Americano de Medicina do Esporte e aprovados pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP Rio Claro. Vinte e quatro ratos da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, pesando 421 ± 32 g, foram utilizados. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco ratos por gaiola) em um biotério com temperatura controlada à 25°C, recebendo ração comercial própria para roedores (Labina-Purina) e água *ad libitum*. Para execução do estudo, todo o procedimento experimental foi realizado com dois grupos separados aleatoriamente, em duas distintas condições de luminosidade: ciclo claro-escuro de 12/12 horas normal, com as luzes acesas das 6:00 às 18:00hs (grupo CN) e ciclo claro-escuro 12/12 horas invertido, com luzes acesas das 18:00 às 6:00hs (grupo CI).

Protocolo Experimental

Inversão do ciclo claro – escuro

Todos os ratos utilizados no presente estudo foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu. Os animais, recebidos no Laboratório de Biodinâmica da Unesp Campus Rio Claro com 45 dias de idade, foram adaptados ao novo Biotério em ciclo claro-escuro normal. Após 20 dias de adaptação às condições laboratoriais, 35 ratos foram alocados ao ambiente com ciclo claro-escuro invertido por um período de 25 dias, sendo submetidos ao início do procedimento experimental apenas com 90 dias de idade. A sala na qual esses ratos foram alojados permanecia escura das 6:00hs às 18:00hs. Para facilitar os momentos de manutenção do Biotério, uma luz infra-vermelha foi utilizada, haja vista que esse tipo de iluminação não é perceptível à linhagem de roedores utilizada no presente trabalho. O ergômetro adotado no estudo para as avaliações físicas realizadas com o grupo CI foi mantido em mesma condição de luminosidade.

A outra parcela de ratos foi mantida em ciclo claro-escuro normal. Da mesma forma que para o grupo claro-escuro invertido, o início do procedimento experimental ocorreu quando os animais atingiram 90 dias de idade.

Seleção dos ratos corredores e adaptação à esteira rolante

Para a realização de testes em esteira há a necessidade de seleção prévia dos animais corredores. A seleção ocorreu em um período de sete dias, nos quais foram escolhidos os ratos que apresentaram resposta positiva ao estímulo de corrida ao menos cinco vezes. Após a seleção, os animais foram submetidos a uma adaptação ao exercício em esteira rolante, com velocidades (5 à 20m/min) e durações (5 à 15min) progressivas. O objetivo da adaptação foi a redução dos

níveis de estresse apresentados pelo animal devido a tarefa ser conhecida sem promoção do treinamento físico.

Cabe ressaltar que todo o procedimento de seleção e adaptação dos ratos ao ergômetro já foi realizado nos respectivos ciclos de luminosidade adotados para os grupos CN e CI.

Avaliações aeróbia e anaeróbia: determinação da velocidade crítica e capacidade de corrida anaeróbia

Os animais foram submetidos ao protocolo composto por 4 testes de corridas exaustivas em velocidades distintas equivalentes à 25, 30, 35 e 40m/min. As velocidades foram alternadas em intervalos de 48 horas e distribuídas randomicamente entre os ratos. Para cada velocidade (V expressa em m/min), foi registrado o tempo de exaustão em segundos (t_{lim}). As velocidades foram selecionadas para que a exaustão voluntária dos animais ocorresse entre 1 e 15 minutos de exercício (Jenkins et al., 1991; Bishop et al., 1998).

Como para humanos, a velocidade crítica (V_{crit}) e a capacidade de corrida anaeróbia (CCA) foram determinadas por relação entre intensidade de exercício (velocidade – V) e tempo de esforço até a exaustão (t_{lim}), através da função matemática hiperbólica ($t_{lim} = CCA / (V - V_{crit})$). Para estimar a V_{crit} e CCA, utilizou-se a linearização da hipérbole ($V = CV + CCA/t_{lim}$), na qual V_{crit} corresponde ao Y-intercepto e CCA, à inclinação da reta de regressão (Figura 7.1) (Hill, 1993).

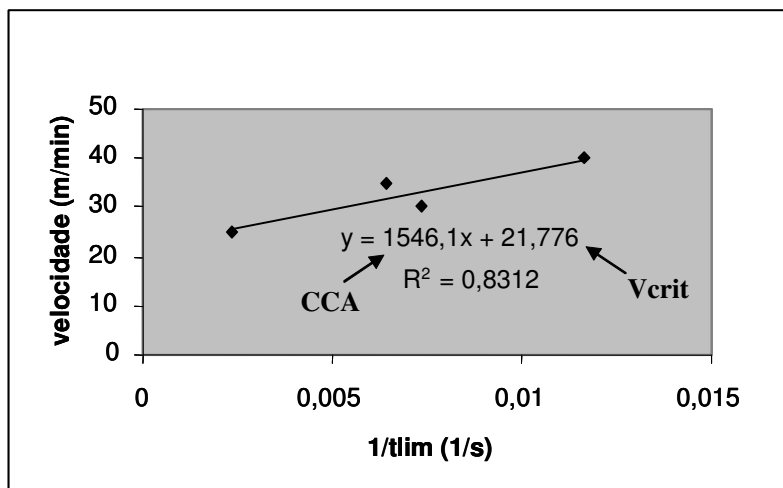


Figura 7.1. Exemplo da regressão linear (velocidade vs. 1/tlim) obtida para um rato. O valor da angulação da reta de regressão corresponde à capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e o Y-intercepto, à velocidade crítica (Vcrit) desse animal.

Análise Estatística

O coeficiente de regressão linear individual do ajuste velocidade vs. 1/tlim foi inicialmente analisado com o objetivo de testar o modelo adaptado à ratos. Também houve aplicação do teste de normalidade Shapiro-Wilks. Para comparação dos parâmetros aeróbio e anaeróbio obtidos em ciclo normal e ciclo invertido, um teste t-Student para medidas independentes foi utilizado. Para todas as análises, o nível de significância foi pré-fixado em 5% (Dawson-Saunders e Trapp, 1994).

RESULTADOS

Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média.

Na figura 7.2 é possível observar o percentual de ratos corredores selecionados nos dois distintos ciclos. Foi detectada diferença estatística no número de ratos selecionados em ciclo normal e em ciclo invertido.

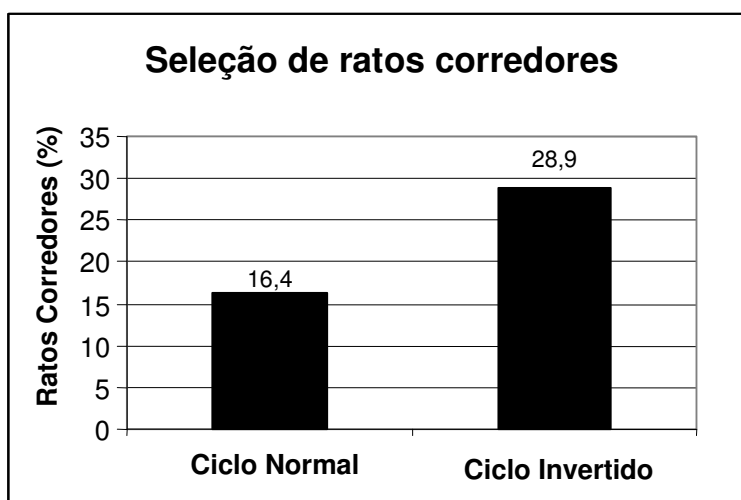


Figura 7.2. Resultados percentuais da seleção de ratos corredores nos dois diferentes ciclos de luminosidade adotados no presente estudo.

Houve distinção da V_{crit} determinada nas duas condições de luminosidade, sendo esta superior no ciclo claro-escuro invertido ($V_{crit\ CN} = 22,8 \pm 0,7$ m/min e $V_{crit\ CI} = 25,5 \pm 0,4$ m/min). Resultados diferentes foram observados para o parâmetro anaeróbico e ajustes matemáticos de regressão linear, sendo que ambos não sofreram interferência da condição de luminosidade (Figura 7.3 e Tabela 7.1).

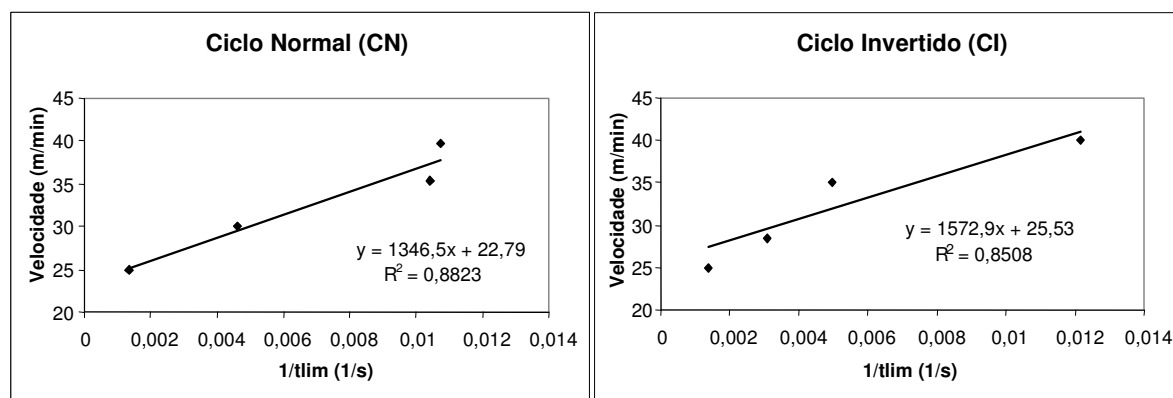


Figura 7.3. Representação gráfica das regressões lineares médias (velocidade vs. 1/tlim) para os grupos ciclo normal (CN) e ciclo invertido (CI).

Tabela 7.1. Resultados de velocidade crítica (V_{crit}), capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e valores de R^2 para os ajustes lineares obtidos para os grupos ciclo normal (n=13) e ciclo invertido (CI) (n=11).

	Ciclo normal			Ciclo invertido		
	V_{crit} (m/min)	CCA (m)	R^2	V_{crit} (m/min)	CCA (m)	R^2
média	22,70	22,80	0,88	25,53 *	21,80	0,85
sem	0,68	2,77	0,03	0,44	4,93	0,02

* Diferença entre os grupos CN e CI

DISCUSSÃO

A carência de metodologias para avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos exercitados dificulta a prescrição de treinamentos físicos com intensidade e duração controlada, bem como a possibilidade de verificação dos prováveis efeitos de tais treinamentos aplicados à roedores de laboratório. Restritos são os testes de avaliação de esforço já adaptados à animais corredores, sendo grande parte utilizando métodos lactacidêmicos invasivos (Pilis et al., 1993, Carvalho et al., 2005, Manchado et al., 2006) ou espirométricos, por análise do consumo máximo de oxigênio (Kemi e Ellingsen, 2005, Wisloff et al., 2001). Nesse sentido, o presente estudo apresenta uma metodologia inicialmente sugerida para humanos, adaptada com sucesso para avaliação de ratos corredores. De acordo com a tabela 7.1, o modelo de potência crítica adaptado à animais corredores nessa pesquisa apresentou um ajuste matemático extremamente satisfatório (figura 7.3), o que possibilita sua utilização para essa espécie de corredores.

Em relação à inversão de ciclo claro-escuro, objeto de investigação no presente estudo, a figura 7.2 demonstra uma maior quantidade de ratos selecionados como predispostos à corrida quando o exercício é executado no período laboratorial noturno. Segundo Refinetti (2006), que realizou um estudo abrangente sobre ciclo claro-escuro e atividade motora estudando diversas espécies de roedores, ratos Wistar, denominados pelo autor como ratos de laboratório, são caracteristicamente noturnos, o que não se aplica à outras espécies de roedores, tais como ratos Nilo Grass. O fato da inversão de ciclo aumentar o percentual de ratos corredores já denota um aspecto positivo dessa manipulação, favorecendo a execução de avaliações e treinamentos aplicados a ratos corredores.

O parâmetro aeróbio sugerido pelo modelo proposto por Monod e Scherrer (1965) denominado potência crítica, em nosso estudo foi adaptado para velocidade (velocidade crítica).

A Vcrit obtida em ciclo claro-escuro normal foi $22,8 \pm 0,07$ m/min, resultado que corrobora com os achados de Manchado et al. (2006a) em mesmo modelo e é similar à máxima fase estável de lactado em ratos corredores, considerada padrão ouro para avaliação aeróbia (Manchado et al., 2005, Manchado et al., 2006b).

Com é possível a visualização na tabela 7.1, foram encontradas diferenças significantes na Vcrit determinada com o grupos de ratos mantidos em ciclo normal (CN) e ciclo invertido (CI), sem alterações na capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e regressões matemáticas de ajuste linear (R^2). Apesar de muitas críticas, de acordo com a proposta teórica inicial do modelo de potência crítica, o parâmetro aeróbio oferecido pela metodologia matemática refere-se a uma capacidade, podendo ser alterado por comportamentos de respostas fisiológicas, ao passo que a capacidade de trabalho anaeróbio, em nosso caso, a CCA, está relacionada à estoque anaeróbio de energia (Bishop et al., 1998), sendo modificada apenas por treinamento e elevação de substratos energéticos. Dessa maneira, parece que os resultados encontrados com ratos fortalecem a hipótese sustentada pelo modelo matemático inicialmente sugerido para avaliação humana.

Como anteriormente descrito, os resultados encontrados no presente estudo evidenciam que o ciclo de luminosidade proveu alteração na avaliação de performance física, especialmente nas respostas aeróbias, sendo o período de escuridão associado à valores elevados de capacidade aeróbia.

Sabe-se que núcleo supraquiasmático do hipotálamo anterior é o grande centro de controle da ritmicidade diária gerando informações como atividade locomotora, temperatura corporal, cortecosterona plasmática e melatonina (Klein et al., 1991), porém diversos são os osciladores associados ao controle de ritmo circadiano em mamíferos (Klein et al., 1991, Van

den Buuse, 1999) A luminosidade é um dos mais importantes fatores extrínsecos ou ambientais promotores de alterações nesse controle, tanto para humanos (Reilly, 1990) quanto para ratos (Edmonds e Adler, 1977, Baumgart et al., 1989, Deprés-Brummer et al., 1995). Dentre as respostas fisiológicas modificadas no período de sono é possível destacar a depressão da atividade simpática e, conseqüentemente a redução da frequência cardíaca, pressão arterial (Van den Buuse, 1999, Van den Buuse, 1994) e tônus muscular. Essas diminuição nas respostas cardiovasculares acarreta uma redução na razão metabólica que pode variar de 10% à 30%. Em nosso experimento, a critério de especulação, acreditamos que a capacidade aeróbia (V_{crit}) possa ser inferior em ciclo normal, devido essas respostas estarem deprimidas no momento inicial da atividade física.

São encontradas há bastante tempo na literatura diversas citações envolvidas com humanos submetidos à esforços físicos em distintos momentos do dia, haja vista que respostas fisiológicas, cognitivas e hormonais podem contribuir ou prejudicar a performance atlética de indivíduos experientes ou não (Winget et al., 1985, Forsyth and Reilly, 2004). Deschenes et al. (1998) verificaram o efeito do horário do dia (8:00, 12:00, 16:00 e 20:00hs) em índices de performance física de homens não treinados, como força, potência e torque, bem como em valores hormonais e de temperatura antes e após os esforços. Nesse estudo foi constatado que em exercícios executados de forma rápida, as respostas de performance são mais afetadas pelo horário diário. Apesar do ritmo circadiano individual ser importante, existem respostas sistemáticas, tais como da pressão arterial e temperatura retal, que são afetadas pelo horário do dia. Da mesma forma, as concentrações plasmáticas de cortisol e testosterona são elevadas as 8:00hs, ao passo que a razão testosterona:cortisol apresenta-se maior no período noturno.

Em pesquisas envolvendo animais e exercício físico, algumas referências utilizando natação e corrida foram localizadas. Kelliher et al. (2000) efetuaram um estudo com ratos

submetidos à natação forçada em período de luminosidade e em momento noturno. Segundo os autores supracitados, os ratos que nadaram na fase escura apresentaram respostas de corticosterona e ácido ascórbico inferiores aos animais que executaram esforços com luminosidade, o que conota um aumento do estresse fisiológico quando os ratos são submetidos ao exercício no período de sono. Ainda utilizando a natação como estímulo de atividade física, Yilmaz et al. (2004) verificaram que ratos mantidos em ciclo normal e posteriormente à luminosidade intensa por 12 horas (ciclo claro-claro) por um dia, apresentaram menor desespero à exposição ao meio líquido em ambiente externo.

Quando a atividade analisada é a resposta espontânea de ratos, um ergômetro muito utilizado é a roda metabólica (Chiesa et al., 2007, Cambras et al., 2000). Assim como em nossa pesquisa, o exercício desenvolvido na roda é a corrida, porém há distinções em aspectos biomecânicos e de respostas fisiológicas. Dentre essas diferenças é possível destacar a resistência à fadiga de músculo isolado (extensor digital longo) após seis semanas treinamento de camundongos em roda metabólica e em esteira rolante (Jeneson et al., 2007). Não foram localizados na literatura estudos comparando a influência do ciclo claro-escuro nas respostas obtidas após treinamento para roedores executado em esteira rolante, o que impede comparações precisas com os resultados do presente estudo. Apesar dessa carência, nossos achados evidenciam importante distinção na resposta aeróbia de ratos corredores submetidos à dois ciclos de luminosidade, o que deve ser considerado em futuros desenhos experimentais utilizando avaliação e treinamento físico aplicados à ratos Wistar em diferentes condições fisiológicas.

De acordo com nossos resultados é possível concluir que há a necessidade de cautela com o ritmo circadiano de roedores na prescrição de exercício em esteira rolante, especialmente devido à condição aeróbia ser elevada quando o ciclo claro-escuro invertido é utilizado.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi suportado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 07070-5/2004) e contou também com o apoio dos órgãos de fomento CAPES e CNPq (Proc. 300270/2004-16). Agradecemos ao apoio técnico de José Roberto Rodrigues da Silva, Eduardo Custódio e à Clarice Yoshiko Sibuya.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUMGART, P.; WALGER, P.; FUCHS, G.; VON EIFF, M.; RAHN; K.H. Diurnal variations of blood pressure in shift workers during day and night shift. **Int Arch Occup Environ Health**, v.61, p.463-6, 1989.
2. BERTHOIN_S.; BAQUET G.; DUPONT G.; VAN PRAAGH E. Critical velocity during continuous and intermittent exercises in children. **Eur J Appl Physiol**. v.98(2), p.132-8, 2006.
3. BISHOP, D.; JENKING, D.G.; HOWARD A. The critical power function is dependent on the duration of predictive exercise tests chosen. **Int J Sports Med** v.19, p.125-129, 1998.
4. BRAGA, L.R.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.54, p.58-65, 2004.
5. BRICKLEY, G.; GREEN, S.; JENKINS, D.G.; MCEINERY, M.; WISHART, C.; DOUST, J.D.; WILLIAMS, C.A. Muscle metabolism during constant and alternating intensity exercise around critical power. **Int J Sports Med**. v.28(4), p.300-5, 2007.

6. CAMBRAS, T.; VILAPLANA, J.; CAMPUZANO, A.; CANAL-CORRETGER, M.M.; CARULLA, M.; DIEZ-NOGUERA, A. Entrainment of the rat motor activity rhythm: effects of the light-dark cycle and physical exercise. **Physiol Behav.**, v.70, p.227-32, 2000.
7. CARVALHO, J.F.; MASUDA, M.O.; POMPEU, F.A. Methods for diagnosis and control of aerobic training in rats based in lactate threshold. **Comp Biochem Physiol part A.**, v.140(4), p. 409-13, 2005.
8. CHIESA, J.J.; DIEZ-NOGUERA, A.; CAMBRAS, T. Effects of transient and continuous wheel running activity on the upper and lower limits of entrainment to light-dark cycles in female hamsters. **Chronobiol Int.** v.24(2), p.215-34, 2007.
9. DAWSON-SAUNDERS, B., TRAPP, R.G. Basic and clinical biostatistic. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.
10. DESCHENES, M.R.; KRAEMER, W.J.; BUSH, J.A.; DOUGHTY, T.A.; KIM, D.; MULLEN, K.M.; RAMSEY, K. Biorhythmics influences on functional capacity of human muscle and physiological responses. **Med Scie Sports Exerc**, v.30(9), p.1399 – 407, 1998.
11. DEPRÉS-BRUMMER, P, LEVI F, METZGER G, TOUITOU Y. et al. Light-induced suppression of the rat circadian system. **Am J Physiol**, v. 268, p.R1111-6, 1995.
12. EDMONDS, S.C.; ADLER, N.T. The multiplicity of biological oscillators in the control of circadian running activity in the rat. **Physiol Behav.** v.18(5), p.921-30, 1977.
13. FERREIRA, J.C.B.; ROLIM, N.P.L.; BARTHOLOMEU, J.B.; GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P.C. Maximal lactate steady state in running mice: effects of

exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol** (OnlineEarly Articles). doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x, 2007.

14. FORSYTH, J.J.; REILLY, T. Circadian rhythms in blood lactate concentration during incremental ergometer rowing. **Eur J appl Physiol**, v. 91(2), p. 69-74, 2004.
15. 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. **Comp Biochem Physiol Part A**, v.130A, p.21-7. 2001.
16. GOBATTO, C.A.; MANCHADO, F.B.; VOLTARELLI, F.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; MELLO, M.A.R.. Non-invasive critical load determination in swimming rats: effects of muscle glycogen depletion. **Med Sci Sports Exerc.** (Suppl), v.37, p.S331, 2005.
17. HILL, D.W. The critical power concept. **Int J Sports Med.** v.16, p.237-254, 1993.
18. JENKINGS, D.G.; QUIGLEY B.M. The y-intercept of critical power function as a measure of anaerobic work capacity. **Ergonomics**, v.34, p.13-22, 1991.
19. JENESON, J.A.; DE SNOO, M.W.; VERLINDEN, N.A.; JOOSTEN, B.J.; DOORNENBA, A.; SCHOT, A.; EVERTS, M.E. Treadmill but not wheel running improves fatigue resistance of isolated extensor digitorum longus muscle in mice. **Acta Physiol** (in press).
20. KELLIHER, P.; CONNOR, T.J.; HARKIN, A.; SANCHEZ, C.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. **Physiol Behav.**, v.69, p.531-9, 2000.
21. KEMI, O.J.; ELLINGSEN, O. Trans-sodium crocetinate does not affect oxygen uptake in rats during treadmill running. **Scand J Clin Lab Invest.** v.65(7), p.577-84, 2005.

22. KLEIN, D.C.; MOORE, R.Y.; REPERT, S.M. **Suprachiasmatic nucleus**. The mind's clock. Oxford University Press, New York, 1991.
23. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol Part A**, v.114 A, p.51-5, 1996.
24. LUI, T.; BORJIGIN, J. Relationship between nocturnal serotonin surge and melatonin onset in rodent pineal gland. **J Circadian Rhythms**, v.4, p.12, 2006.
25. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Máxima fase estável de lactato é ergometro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Rev Bras Med Esporte**, v.12, p. 259-62, 2006a.
26. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.31, p.731-736, 2006b.
27. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. **J Exerc Physiol online**, v.8, p.29-35, 2005.
28. MARANGON, L.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; KOKUBUN, E. Utilization of an hyperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc (Suppl)**, v.34, p.149, 2002.
29. MONOD, H., SCHERRER, J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics**, v.8, p.329-38, 1965.

30. MORTON, R.H.; BILLAT, V.L. The critical power model for intermittent exercise. **Eur J Appl Physiol**, v.91, p.303-7, 2004.
31. MORTON, R.H. The critical power and related whole-body bioenergetic models. **Eur J Appl Physiol**, v.96(4), p.339-54, 2006.
32. MROSOVSKY, N. Locomotor activity and non photic influence on circadian clock. **Biol Rev**, v.71, p.343-72, 1996.
33. OLIVEIRA, C.A.M; LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. The role of exercise on long term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Exp Physiol**, v. 90, p.79-86, 2005.
34. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106 A, p.285-289, 1993.
35. REFFINETI, R. Variability of diurnality in laboratory rodents. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**. v.192(7), p.701-14, 2006.
36. REILLY, T. Human circadian rhythms and exercise. **Crit Rev Biomed Eng**. v.18(3), p.165-80, 1990.
37. VAN DEN BUUSE, M. Circadian rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in spontaneously hypertensive rats as measured with radio-telemetry. **Physiol Behav**. v.55(4), p.783-7, 1994.
38. VAN DEN BUUSE, M. Circadian rhythms of blood pressure and heart rate in conscious rats: Effects of light cycle shift and timed feeding. **Physiol Behav**, v.68, p. 9-11, 1999.
39. VANHATALO, A.; DOUST J.H.; BURNLEY M. Determination of Critical Power Using a 3-min All-out Cycling Test. **Med Sci Sports Exerc**, v.39(3), p. 548-55, 2007.

40. VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.
41. WINGET, C.M., DEROSHIA, C.W., HOLLEY, D.C. Circadian rhythms and athletic performance. **Med Sci Sports Exerc**, v.17(5), p.498-516, 1985.
42. YILMAZ, A.; AKSOY, A.; CANBEYLI, R. A single day of constant light (L/L) provides immunity to behavioral despair in female rats maintained on an L/D cycle. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28(8), p.1261-5, 2004.

ESTUDO 8

LIMIAR ANAERÓBIO EM CORRIDA E NATAÇÃO PARA RATOS: DETERMINAÇÃO POR CONCENTRAÇÃO FIXA DE LACTATO E BISSEGMENTAÇÃO DA CURVA LACTACIDÊMICA

Fúlvia de Barros Manchado^{1,2}, Claudio Alexandre Gobatto¹, Carla Ribeiro¹, Clécia Soares de Alencar Mota¹, Gustavo Gomes de Araujo¹, Michel Barbosa de Araújo, Maria Alice Rostom de Mello¹

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil

2- Faculdades Integradas Einstein de Limeira- Fiel – Limeira – Brasil

Submetido para o periódico “Medicine & Science and Sports & Exercise”

RESUMO

O limiar anaeróbio (LAn) obtido por teste progressivo e determinação da curva lactacidêmica é bastante aplicado à avaliação aeróbia humana. Uma ferramenta importante para estudos em fisiologia e áreas correlatas é a aplicação de modelos experimentais utilizando animais. O objetivo do estudo foi verificar a possibilidade de determinação do LAn em teste progressivo de natação e corrida para ratos, com a utilização de dois métodos matemáticos de análise: concentração fixa de lactato e bissegmentação da curva lactacidêmica. Foram utilizados 19 ratos nadadores e 29 ratos corredores, devidamente selecionados e adaptados ao seu ergômetro. Tanto em natação quanto em corrida, o protocolo de cargas progressivas foi composto por estágios de 5 minutos de esforço, com coletas de sangue extraídas após cada estágio para determinação da concentração de lactato. Em natação, as cargas atadas foram 3,5; 4,0; 4,5; 5,0, 5,5; 6,0% do peso corporal e na esteira, as velocidades adotadas foram 10, 15, 20, 25, 30 e 35 m/min. A partir de gráficos individuais de intensidade vs. concentração de lactato foi possível a aplicação de modelos matemáticos para de obtenção do LAn. O primeiro foi o tratamento dos pontos com ajuste exponencial de segunda ordem para determinação do LAn por concentração fixa de lactato. Tanto em esteira quanto em natação, foram obtidas as intensidades equivalentes às concentrações 4,0; 4,5, 5,0 e 5,0mmol/L. O segundo ajuste adotado foi a inspeção visual da inflexão da curva lactacidêmica, seguida por bissegmentação das retas de regressão. Houve a aplicação de Anova one-way, com teste post-hoc Newman-Keuls, para comparar as intensidades equivalentes ao LAn obtidas pelos métodos matemáticos empregados ($P < 0,05$). Para natação, 63,2% dos animais apresentaram sucesso na determinação do LAn por concentração fixa 5,5mmol/L, em carga equivalente à $4,2 \pm 0,1\%$ pc. Em corrida, a bissegmentação das retas foi possível com 67,2% da amostra, com LAn igual a $21,1 \pm 0,9$ m/min. De acordo com os resultados, não é possível, em teste progressivo aplicado à ratos exercitados em natação, obter curvas lactacidêmicas satisfatórias. Nesse ergômetro, a melhor análise para determinar o LAn deve ser executada por concentração fixa de lactato na faixa de 5,0 à 5,5mmol/L. Já em corrida, a inspeção visual seguida por bissegmentação das retas de regressão parece ser o método mais adequado para determinação do LAn de ratos Wistar.

Palavras-chave: teste progressivo, limiar anaeróbio, natação, corrida, ratos

ABSTRACT

The anaerobic threshold (AT) obtained by progressive test and the determination of the lactate curve is often applied for human aerobic evaluation. The experimental models using animals have been extensively adopted in exercise physiology and correlated areas. The aim of the present study has been to verify the possibility of anaerobic threshold determination with incremental test in swimming and running rats, using two mathematical methods for analysis of results: fixed blood lactate concentration and visual inspection of inflection point preceded by bi-segmental linear regression. For this, 19 swimming rats and 29 running rats were used. In both ergometers, the incremental test was composed by 5 minutes of exercise with blood collection after each load for lactate concentration determination. The loads in the swimming test were 3.5; 4.0; 4.5; 5.0, 5.5; 6.0% of body weight (bw) and in the treadmill running the velocities adopted were 10, 15, 20, 25, 30 e 35 m/min. Individual curves (intensity vs. blood lactate concentration) were plotted and it was applied different mathematical models for AT determination were applied. The first method was the exponential adjustment for AT determination by fixed blood lactate concentration in four values (4.0; 4.5, 5.0 e 5.0mmol/L). The second adjustment adopted was the individual visual inspection of inflection point of the lactate curve, preceded by intersection of the bi-segmental linear regression. The AT intensities were compared by one-way Anova and Newman-Keuls post-hoc test ($P < 0,05$). In swimming, 63.2% of the rats showed satisfactory results in AT determination using fixed blood lactate in 5.5mmol/L ($4,2 \pm 0.1\%$ bw). In treadmill running, the bi-segmental linear regression method was possible with 67.2% of animals, indicating AT in 21.1 ± 0.9 m/min. According the results, in incremental test applied to swimming rats is not possible to obtain satisfactory lactacidemic curves. The best analysis for AT determination in swimming rats seems to be fixed blood lactate in concentrations 5.0 and 5.5mmol/L. In treadmill running, the visual inspection preceded by bi-segmental linear regression seems to be the adequate method for AT determination of Wistar rats.

Key-words: incremental test, anaerobic threshold, swimming rats, running rats

INTRODUÇÃO

A utilização de testes com intensidades progressivas e verificação de respostas fisiológicas nessas intensidades para determinar a máxima intensidade de esforço com característica predominantemente aeróbia é muito freqüente na fisiologia do exercício. Dentre as variáveis mais utilizadas para essa análise é possível destacar a ventilação pulmonar (Wasserman e McIlroy, 1964, Bentley e McNaughton, 2004), a freqüência cardíaca (Dumke et al., 2007, Debray e Dey, 2007, Bodner et al., 2002, Comconi et al., 1982) e a lactacidemia sanguínea (Kinderman et al., 1979; Sjödín e Jacobs, 1981).

Nesse sentido, diversos são os estudos que determinaram a intensidade equivalente ao limiar anaeróbio (LAn) em humanos com a aplicação de protocolo progressivo e análise da lactacidemia sanguínea (Mader et al., 1978, Weltman et al., 1990, Carter et al., 1999, Forsyth and Reilly, 2004).

Uma maneira de analisar as respostas de lactato sanguíneo em teste progressivo é a observação do ponto de inflexão da curva lactacidêmica a partir do qual há um aumento desproporcional entre a produção e remoção desse metabólito. Esse método é identificado por inspeção visual executada por avaliadores experientes. Recentemente, pesquisadores vêm utilizando essa análise, precedida por bissegmentação das retas de regressão, como proposto por Hinckley (1969). A partir da bissegmentação, é possível encontrar o ponto de intersecção entre as duas retas ajustadas, interpretado como intensidade individual de LAn. Para execução desse método, há a necessidade de ao menos quatro estágios completos em um teste progressivo, com o lactato sanguíneo apresentando resposta bem característica da esperada em um teste incremental.

Segundo Sjdin e Jacobs (1981) e Mader and Heck (1986), o LAn pode também ser determinado por concentração fixa de lactato sanguíneo. De acordo como os autores, 4mmol/L parece ser a concentração associada à intensidade de LAn em corrida, na qual a produção de lactato é equivalente à sua remoção. Dessa maneira, sugeriram o método também conhecido por “onset blood lactate accumulation” (OBLA). A utilização de concentração fixa de lactato para análise do LAn, porém, necessita de cautela no sentido de que é possível a variação dessa concentração de acordo com o ergômetro utilizado (Pereira et al, 2001, Beneke, 2003, Manchado et al., 2006a). Essa afirmação pode ser explicada pela variação de concentração de lactato associada à máxima fase estável desse metabólito (MFEL) em teste contínuo executado em distintos exercícios (Heck et al., 1985; Beneke, 2003, Billat et al., 2003).

Um dos recursos adotados com frequência por áreas que estudam ou utilizam o exercício na prevenção ou controle de patologias é o modelo animal, especialmente com mamíferos de pequeno porte. Os ratos, por exemplo, são comumente submetidos à esforços crônicos ou agudos em diversos ergômetros, sendo posteriormente analisados de maneira invasiva ou não, para detecção dos efeitos positivos e/ou deletérios promovidos pela atividade física.

Assim como em humanos, não existe a possibilidade de avaliação dos resultados promovidos pelo esforço físico aplicado à ratos, caso a intensidade, volume e frequência de exercício não sejam controlados de maneira detalhada. Nesse sentido, diversas pesquisas expressivas têm objetivado padronizar protocolos para avaliação física de roedores exercitados em natação (Gobatto et al., 2001, Voltarelli et al., 2002, Manchado et al., 2006b) e corrida em esteira rolante (Billat et al., 2005, Manchado et al., 2005, Ferreira et al., 2007).

Devido à necessidade de apenas um dia de teste para determinação do LAn, alguns estudos adaptaram o teste progressivo inicialmente sugerido para de humanos, à avaliação

aeróbia de ratos corredores (Pilis et al., 1993; Langfort et al., 1996, Carvalho et al., 2005). Em natação, poucos trabalhos com essa metodologia são encontrados e a curva lactacidêmica em teste incremental nesse tipo de exercício parece não revelar comportamento similar ao observado em humanos (Gobatto et al., 1991).

Devido à importância da avaliação de ratos exercitados e a grande expressão de protocolos com incrementos de intensidade aplicados a humanos, o objetivo do presente estudo foi verificar a possibilidade de determinação do limiar anaeróbio em teste progressivo de natação e corrida para ratos Wistar, com a utilização de dois métodos matemáticos de análise: concentração fixa de lactato e bissegmentação da curva lactacidêmica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os experimentos executados com os animais foram conduzidos de acordo com a política do Colégio Americano de Medicina do Esporte e aprovados pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP Rio Claro. Quarenta ratos da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, pesando 425 ± 29 g, foram utilizados. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco ratos por gaiola) em uma sala iluminada com ciclo claro-escuro de 12:00-12:00hs e temperatura de 25°C. Os ratos receberam ração comercial própria para roedores (Labina-Purina) e água *ad libitum*.

Protocolo Experimental

Inicialmente, os animais foram separados, selecionados e adaptados aos respectivos ergômetros nos quais posteriormente seriam avaliados.

Adaptação ao meio líquido

Dezenove animais foram submetidos ao teste progressivo para determinação do limiar anaeróbio em natação. Anteriormente à realização dos testes, os ratos foram adaptados ao meio líquido de forma padronizada. A adaptação ocorreu no período total de 15 dias ininterruptos, em um tanque cilíndrico com superfície lisa, medindo 60cm de diâmetro por 120cm de profundidade (Marangon et al., 2002), com a temperatura da água mantida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Harri e Kuusela, 1986). O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal sem, entretanto, promover adaptações fisiológicas decorrentes do treinamento físico.

Os ratos foram inseridos em água rasa por três dias durante quinze minutos. Posteriormente, o nível da água foi aumentado, bem como o tempo de duração do esforço e a carga a ser sustentada pelo animal. Assim, no quarto dia, os ratos nadaram em água profunda por dois minutos, com acréscimo de dois minutos a cada dia até o décimo dia de adaptação. No décimo primeiro dia, os animais foram submetidos ao exercício de natação por cinco minutos suportando uma carga de 3% de seu peso corporal, com acréscimos de cinco minutos a cada dia, quando, no décimo quinto dia, encerrou-se a adaptação.

Seleção dos ratos corredores e adaptação à esteira rolante

Para a execução do protocolo progressivo em esteira rolante houve a necessidade de seleção prévia dos animais corredores. A seleção ocorreu em um período de sete dias, nos quais foram escolhidos os 29 ratos que apresentaram resposta positiva ao estímulo de corrida ao menos cinco vezes. Após a seleção, os animais foram submetidos a uma adaptação ao exercício em esteira rolante, com velocidades (5 à 20m/min) e durações (5 à 15min) progressivas. O objetivo da adaptação também foi a redução dos níveis de estresses apresentados pelo animal devido a tarefa ser conhecida sem promoção do treinamento físico.

Protocolo Progressivo para determinação do limiar anaeróbio

Todo o protocolo experimental foi realizado em condições ambientais idênticas às ocorridas durante o período de adaptação, tanto na natação quanto na esteira rolante.

Em ambos os exercícios, o protocolo para a determinação do limiar anaeróbio foi composto por um teste de incremento de cargas com estágio de 5 minutos. Houve coleta de sangue da cauda dos ratos no início dos testes e ao final de cada estágio completo, para posterior determinação da curva lactacidêmica. Esse procedimento foi realizado até a exaustão voluntária dos ratos. As intensidades impostas aos animais bem como os critérios de exaustão adotados nos dois distintos ergômetros serão descritos a seguir.

Protocolo progressivo em natação

Os ratos foram submetidos individualmente ao protocolo progressivo suportando cargas equivalentes à 3,5; 4,0; 4,5; 5,0, 5,5; 6,0% do peso corporal (pc), atadas ao dorso. Os animais realizaram esforços em tanque profundo e o critério de exaustão adotado foi a não manutenção do nado em superfície e a perda de movimentos simétricos responsável pelo deslocamento do rato ao fundo do tanque. Para análise, foram considerados estágios completos.

Protocolo progressivo em esteira rolante

No protocolo realizado em esteira rolante, o aumento da intensidade foi executado por modificações na velocidade imposta para a corrida. As velocidades utilizadas nesse teste foram 10, 15, 20, 25, 30 e 35 m/min. A esteira rolante utilizada foi composta por oito baias individuais, com o dispositivo de choque elétrico desligado, reduzindo o efeito do estresse na realização do esforço pelo animal. O critério de exaustão adotado na avaliação realizada nesse ergômetro foi a não manutenção da corrida na velocidade proposta por 5 segundos. Do mesmo modo que na natação, foram considerados válidos para as análises efetuadas apenas os estágios concluídos com sucesso.

Extração de amostras sanguíneas e análise

Durante os testes progressivos, amostras sanguíneas (25 μ l) foram extraídas da cauda dos animais nos tempos já descritos e depositadas em tubos *Eppendorf* (capacidade de 1,5 ml), contendo 50 μ l de fluoreto de sódio (1%). Para evitar a diluição do sangue na água no caso dos nadadores, os animais foram retirados do cilindro e secos, retornando ao meio líquido imediatamente após a coleta sanguínea. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas em um analisador de lactato (Modelo YSI 1500 Sport, Yellow Springs, OH, EUA).

Análises Matemáticas para obtenção do Limiar anaeróbio nos dois ergômetros utilizados

Na tentativa de obtenção da intensidade de limiar anaeróbio para ratos exercitados em diferentes ergômetros, foram utilizados dois métodos matemáticos distintos: determinação do limiar anaeróbio por concentração fixa de lactato, método este também denominado OBLA

(Sjödán e Jacobs, 1981) e análise da curva lactacidêmica por bissegmentação das retas de regressão (Hinkley, 1969).

Método de obtenção do LAn por concentração fixa de lactato

Assim como inicialmente proposto para avaliação humana (Sjödin e Jacobs, 1981), optamos por tentar determinar o LAn de ratos submetidos à exercício progressivo em natação e corrida em esteira rolante. Para isso foram plotados gráficos individuais de lactacidemia sanguínea vs. intensidade de exercício. Os pontos obtidos foram submetidos ao ajuste exponencial de crescimento (segunda ordem), para possível determinação da intensidade associada a concentração fixa de lactato. Tanto em natação como em corrida, foram obtidas as intensidades equivalentes às concentrações de lactato 4,0; 4,5, 5,0 e 5,0mmol/L (figura 8.1.a).

Método de bissegmentação das retas de regressão

Para determinação do LAn pelo método de bissegmentação das retas de regressão, os dados lactacidêmicos foram também plotados em gráficos individuais (lactato vs. intensidade de exercício). Através de inspeção visual executada por dois avaliadores com experiência nessa análise, o ponto de inflexão da curva lactacidêmica foi identificado, sendo este interpretado como instante no qual as respostas de lactato apresentaram aumento exponencial em relação à intensidade de exercício. A partir da visualização desse ponto de inflexão, a curva de lactato foi seccionada e duas distintas retas (figura 8.1.b). Posteriormente, foram igualadas as equações das duas retas e determinou-se o ponto de intersecção entre elas. De acordo com esse método, o ponto de intersecção obtido revela a intensidade equivalente ao limiar anaeróbio (LAn).

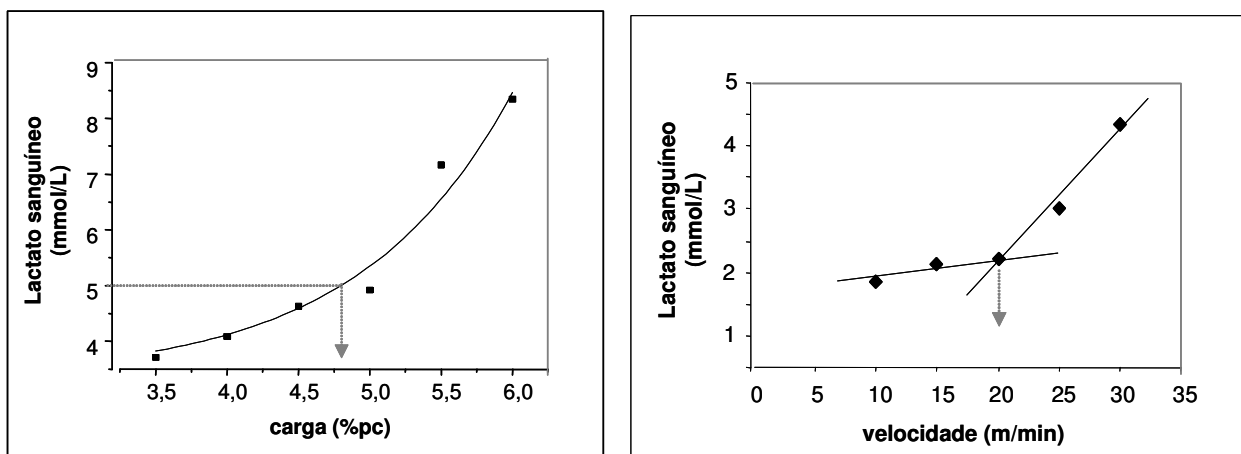


Figura 8.1.a. Representação gráfica da análise de limiar anaeróbio por concentração fixa de lactato para um rato submetido ao teste em natação. **b.** análise matemática do limiar anaeróbio por bissegmentação das retas de regressão em rato corredor.

Análise Estatística

A análise dos dados foi possível com o auxílio dos pacotes estatísticos Origin 6.0 e Statística 5.0. Inicialmente foi utilizada análise descritiva para apresentação de percentuais de sucesso nas análises matemáticas realizadas, assim como um teste de frequências para identificar o método capaz de identificar o LAn para uma maior quantidade de animais. Houve a aplicação de Anova one-way, com teste post-hoc Newman-Keuls, quando necessário, para comparar as intensidades equivalentes ao LAn obtidas pelos dois métodos matemáticos adotados. Em todos os procedimentos estatísticos, o nível de significância foi prefixado em $P < 0,05$ (Dawson-Saunders e Trapp, 1994).

RESULTADOS

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média.

Na figura 8.2 estão expressos os percentuais de sucesso na determinação do limiar anaeróbio através dos métodos matemáticos utilizados nos dois ergômetros, natação e corrida em esteira rolante, sendo os limiares definidos a partir de diferentes concentrações fixas de lactato ou pelo ajuste bissegmentado.

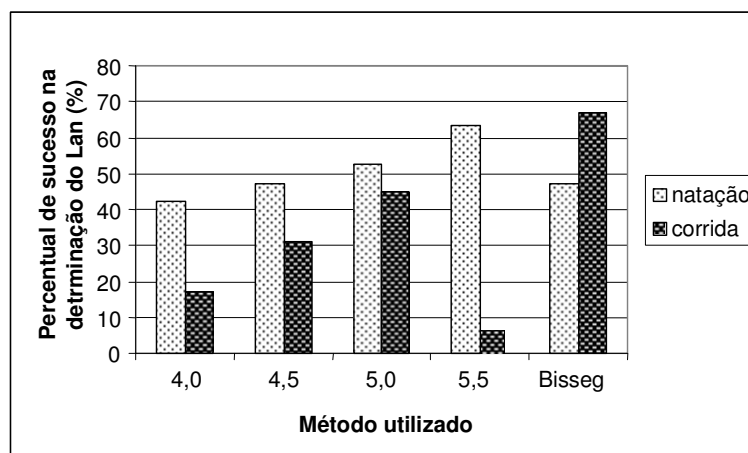


Figura 8.2. Percentuais de sucesso na determinação do limiar anaeróbio em natação e corrida em esteira rolante. No eixo x estão expressos os métodos matemáticos utilizados para a análise, sendo eles concentração fixa de lactato em valores equivalentes à 4,0; 4,5; 5,0; 5,5mmol/L e bissegmentação das retas de regressão.

A tabela 8.1 apresenta os valores de intensidade de LAn determinados por todos os métodos utilizados, nos dois ergômetros. Anova one-way revelou distinção entre o método bissegmentado e as demais análises por concentração fixa, em ambos os ergômetros.

Tabela 8.1. Resultados de limiar anaeróbio determinados pelas distintas formas de análise utilizadas (concentrações fixas ou bissegmentação), em dois ergômetros: natação e corrida em esteira rolante. Os parâmetros apresentados são a intensidade do exercício equivalente ao LAn, o número de ratos que apresentaram tal possibilidade de análise (n) e o valor de R² para o ajuste exponencial de crescimento (concentrações fixas de lactato).

		Método de análise					
		4,0	4,5	5,0	5,5	R ²	bisseg
natação	Carga (%pc)	3,8	4,0	4,1	4,2	0,90	4,6 *
	sem	0,1	0,0	0,1	0,1	0,30	0,3
	n	8	9	10	12	19	9
corrida	Velocidade (m/min)	26,7	28,0	26,9	27,1	0,84	21,1 *
	sem	2,9	2,0	1,6	0,8	0,50	0,9
	n	13	9	5	2	29	18

Resultados expressos em média ± erro padrão da média. * diferença significativa entre método de bissegmentação e todos os outros valores obtidos por concentração fixa de lactato (P<0,05).

DISCUSSÃO

A utilização de testes progressivos objetivando a identificação do limiar anaeróbio é muito freqüente em pesquisas aplicadas à humanos. Um dos motivos pelo qual esse protocolo é comum está relacionado à possibilidade de obtenção do LAn com apenas uma sessão de teste. Dentre as respostas fisiológicas que são comumente adotadas para avaliação, é possível destacar a lactacidemia, a partir da qual é possível determinar matematicamente o LAn em teste incremental por dois distintos métodos: concentração fixa de lactato ou inspeção visual para detecção do ponto de inflexão da curva desse metabólito. Esse segundo procedimento pode ser precedido por análise de bissegmentação das retas de regressão. Ambos os métodos foram utilizados no presente estudo, para avaliação aeróbia de ratos submetidos aos testes progressivos executados em natação e corrida em esteira rolante (figura 8.1).

Foram selecionadas a natação e a corrida para avaliação de ratos Wistar devido à grande aplicação desses exercícios em pesquisas na área da saúde. Protocolos progressivos similares já haviam sido relatados por Gobatto et al. (1991), em natação, e por Pilis et al. (1993) e Langfort et al. (1996), avaliando ratos corredores. Porém, a maior justificativa para a origem do presente estudo foi a contradição relatada por esses autores nos distintos ergômetros. Em corrida, as respostas lactacidemicas em teste de multiestágio apresentaram similaridade com as observadas em humanos submetidos à avaliação em mesmo exercício, com comportamento exponencial. Dessa maneira, Pilis et al. (1993) e Langfort et al. (1996) sugerem a utilização de tal procedimento quando objetiva-se identificar a intensidade de transição entre predominância energética aeróbia/anaeróbia. Não obstante, Gobatto et al. (1991) relataram a impossibilidade de avaliação do LAn em teste progressivo executado em natação com ratos, devido à respostas de lactato apresentarem-se lineares e não exponenciais durante o protocolo. Desse modo, identificamos a distinção entre respostas para esse tipo de avaliação em dois ergômetros, o que nos motivou a aplicarmos diversas formas de análise aos resultados observados em testes progressivos realizados em esteira e natação.

Os percentuais de sucesso na determinação do LAn por concentração fixa de lactato e bissegmentação das retas de regressão estão expressos na figura 8.2. As concentrações fixas adotadas, tanto para natação quanto para corrida, foram 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5mmol/L. Cabe ressaltar que a seleção dessas concentrações não foi aleatória, sendo baseada em valores obtidos por método de máxima fase estável de lactato sanguíneo nos dois exercícios adotados (Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2005).

Em natação, houve grande possibilidade de determinação do LAn pelo método de concentração fixa de lactato em 5,5mmol/L (63,2%), sucesso esse precedido pela utilização do mesmo método, com concentração fixa de 5,0mmol/L (52,6%). Essas concentrações são

similares às obtidas em protocolo de máxima fase estável de lactato para natação, considerado teste padrão ouro para avaliação aeróbia (Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2006a; Manchado et al., 2006b; Contarteze et al., 2007). Em exercício de corrida, foi evidente a dificuldade de obtenção do LAn por concentração fixa de lactato (melhor sucesso 44,8% de obtenção, para concentração fixa 4,0mmol/L), sendo o procedimento de inspeção visual e bissegmentação das retas de regressão aparentemente mais indicado para determinação de tal intensidade, ao menos no aspecto do sucesso na identificação (62,1%).

Assim como sugerido por Gobatto et al. (1991), um baixo percentual de animais submetidos à avaliação incremental em natação apresentou curvas lactacidêmicas características, capazes de revelar um comportamento exponencial do lactato concomitantemente ao aumento progressivo da intensidade. Já ratos corredores, em concordância com os achados de Pilis et al. (1993) e Langfort et al. (1996) expressam, de maneira mais evidente e em maior quantidade, curvas de lactato sanguíneo similares às obtidas em mesmo teste aplicado em humanos. No âmbito da especulação, sugerimos que um provável fator responsável pela distinção entre respostas lactacidêmicas progressivas em natação e corrida seja a vasoconstrição na cauda dos animais. Em natação há um aumento progressivo do lactato nos estágios iniciais do teste, porém, respostas desproporcionais elevadas não são observadas em intensidades superiores ao LAn, diferente do que é observado em corrida. Como as coletas de sangue são efetuadas pela extremidade distal da cauda do animal, é possível que em natação, a vasoconstrição promovida por descarga adrenérgica supra LAn seja potencializada por associação ao estresse do animal submetido ao meio líquido, refletindo no aumento linear desse metabólito. Segundo Contarteze et al. (2007), em intensidades superiores à máxima fase estável de lactato, o estresse promovido pela natação supera o proporcionado pela corrida em esteira rolante, mesmo com ausência de choque elétrico.

Resultados interessantes podem ser observados na tabela 8.1. Em ambos os ergômetros não foram encontradas distinções entre as intensidades de LAn obtidas por concentração fixa, independente do valor de lactato adotado (4,0; 4,5; 5,0; 5,5mmol/L). Nas análises efetuadas em natação, a carga equivalente ao LAn obtido por esse método variou de 3,8 a 4,2%pc. Esses valores são minimamente inferiores com os achados de Gobatto et al. (2001), Manchado et al. (2006a), Manchado et al. (2006b), Araujo et al. (in press), que determinaram a intensidade de transição aeróbia/anaeróbia avaliando ratos nadadores por outros protocolos.

Em esteira rolante, analisando isoladamente o LAn determinado por método de concentração fixa, também não foram observadas distinções entre as velocidades. Cabe ressaltar que os valores encontrados por esse método superestimam a intensidade do limiar, em comparação à obtida por teste similar (Pilis et al., 1993) e por protocolo de máxima fase estável de lactato (Manchado et al., 2005).

Enfatizando a utilização do procedimento matemático de bissegmentação das retas de regressão, a ANOVA one-way revelou que, para os dois exercícios analisados, os valores de LAn foram diferentes dos observados para todas as concentrações fixas de lactato adotadas. Ratos nadadores apresentam carga de LAn por bissegmentação, aproximadamente 12% superior aos determinados por concentração fixa. Apesar da diferença estatística, o percentual da distinção é mínimo. O contrário pode ser verificado em corrida, haja vista que a faixa de distinção entre análise por bissegmentação e outros procedimentos foi, em média, 29,5%. Um importante aspecto a ser ressaltado é que, além do elevado percentual de sucesso na determinação, o método de bissegmentação aplicado à ratos corredores sugere a intensidade de LAn em $21,1 \pm 0,9$ m. Manchado et al. (2005), Manchado et al. (2006a) e Contarteze et al. (2007) também relataram intensidade similar (20m/min) como sendo a máxima fase estável de lactato de ratos Wistar avaliados em corrida.

Assim como descrito para outras avaliações fisiológicas, há a necessidade de cautela quando um teste progressivo é analisado, devido à protocolo-dependência possível de ser visualizada também em nosso estudo. A grande importância da presente pesquisa encontra-se na sugestão de métodos matemáticos mais adequados para detecção de resultados fornecidos por teste incremental em cada um dos ergômetros utilizados.

De acordo com os resultados, não é possível, em teste progressivo aplicado à ratos exercitados em natação, obter curvas lactacidêmicas satisfatórias. Nesse ergômetro, a melhor análise para determinar o LAn deve ser executada por concentração fixa de lactato na faixa de 5,0 à 5,5mmol/L. Já em corrida, a inspeção visual associada à bissegmentação das retas de regressão parece ser o método mais adequado para determinação do LAn de ratos Wistar.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi suportado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 07070-5/2004) e contou também com o apoio dos órgãos de fomento CAPES e CNPq (Procs. 300270/2004-16, 301601/2006-2). Agradecemos ao apoio técnico de José Roberto Rodrigues da Silva, Eduardo Custódio e à Clarice Yoshiko Sibuya.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENEKE R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v. 89, p.95-9, 1995.
2. BENEKE, T. Maximal lactate steady state concentration (MLSS): experimental and modelling approaches. **Eur J Appl Physiol**. v.88, p.361-9, 2003.

3. BENTLEY, D.J., MCNAUGHTON, L.R. Circadian rhythms in blood lactate concentration during incremental ergometer rowing. **Eur J Appl Physiol**, v.92, p.69-74, 2004.
4. BILLAT, V. L.; MOUISEL, E.; ROBLOT, N.; MELKI, J. Inter- and intra-strain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol**, v.98(4), p.1258-63, 2005.
5. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v.33(6), p.407-26, 2003.
6. BODNER, M.E., RHODES, E.C., MARTIN, A.D., COUTS, K.D. The relationship of the heart rate deflection point to the ventilatory threshold in trained cyclists. **J Strength Cond Res**. v.16, p.573-80, 2002.
7. CARTER, H.; JONES, A.M.; DOUST, J.H. Effect of incremental test protocol on the lactate minimum speed. **Med Sci Sports Exerc**, v.31, p.837-45, 1999.
8. CARVALHO, J.F.; MASUDA, M.O.; POMPEU, F.A. Methods for diagnosis and control of aerobic training in rats based in lactate threshold. **Comp Biochem Physiol part A.**, v.140(4), p.409-13, 2005.
9. CONCONI F, FERRARI M, ZIGLIO PG, DROGHETTI P, CODECA L. Determination of the anaerobic threshold by a noninvasive field test in runners. **J Appl Physiol**, v.52, p. 869-873, 1982.
10. DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP R.G. **Basic and clinical biostatistic**. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.

11. DEBRAY, P., DEY, S. K. A comparison of the point of deflection from linearity of heart rate and ventilatory threshold in the determination of the anaerobic threshold in Indian boys. **J Physiol Anthropol.** v.26(1), p. 31-7, 2007.
12. DUMKE, C.L., BROCK, D.W., HELMS, B.H., HAFF, G.G. Heart rate and lactate threshold and cycling time trials. **J Strength Cond Res.** v.20(3), p.601-7, 2006.
13. FERREIRA, J.C.B; ROLIM, N.P.L.; BATHOLOMEU, J.B.; GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P.C. Maximal lactate steady state in running mice: effects of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** Doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x, 2007.
14. FORSYTH, J.J., REILLY, T. Circadian rhythms in blood lactate concentration during incremental ergometer rowing. **Eur J Appl Physiol.** v.92, p.69-74, 2004.
15. GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C. Y.; MELLO, M. A. R. 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, p.725-6, 1991.
16. 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. **Comp Biochem Physiol**, v.130A, p.21-7, 2001.
17. HARRI, M.; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold expose for rats? **Acta Physiol Scand**, v.126, p.189-97, 1986.
18. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. **Int J Sports Med**, v.6, p.117-30, 1985.

19. HINKLEY, D.V. Inference about the intersection in two-phase regression. **Biometrika**, v. 56, p. 495-504, 1969.
20. KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol**, v.42, p.25-34, 1979.
21. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.114 A, p.51-5, 1996.
22. MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int J Sports Med**, v.7, p.45-65, 1986.
23. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. **J Exerc Physiol online**, v.8, p.29-35, 2005.
24. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Máxima fase estável é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12(5), p.259-262, 2006a.
25. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.31, p.731-736, 2006b.

26. MARANGON, L., GOBATTO, C. A., MELLO, M. A. R., AND KOKUBUN, E.
Utilization of an hyperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc (Suppl)**, v.34(5):149, 2002.
27. PEREIRA, R.R.; ZAGATTO, A.M.; PAPOTI, M.; GOBATTO, C.A. Validação de dois protocolos de teste para determinação do limiar anaeróbio em natação. **Motriz**, v.8, p.63-8, 2002.
28. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106A, p.285-9. 1993.
29. SJÖDIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int J Sports Med**, v.2, p.23-6, 1981.
30. VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.
31. WASSERMAN, K.; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am J Cardiol**, V.14; P. 844-852, 1964.
32. WELTMAN, A.; SNEAD, D.; STEIM, P.; SEIP, R.; SCHURRER, R.; RUTT, R.; WELTMAN, J. Reliability and validity of a continuous incremental treadmill protocol for the determination of lactate threshold, fixed blood lactate concentrations and VO_{2max} . **Int J Sports Med**, v.11, n.1, p.26-32, 1990.

6. DISCUSSÃO GERAL

A importância em determinar com precisão a intensidade de exercício não está resumida apenas à trabalhos nos quais seres humanos são objetos de estudo. Isso porque os modelos experimentais utilizando animais, na maioria dos casos, são elaborados para simular situações ocorridas com humanos e solucionar eventuais problemas decorrentes das alterações observadas.

Os exercícios de natação e corrida em esteira rolante são muito utilizados para o treinamento de ratos em distintas condições fisiopatológicas, porém são restritas as informações sobre a caracterização do esforço nesses ergômetros. Os protocolos sugeridos na presente tese fornecem a possibilidade da determinação individual da intensidade de exercício na natação e corrida em esteira rolante aplicado a ratos sedentários, possibilitando a individualização do treinamento físico e acompanhamento das respostas obtidas após a prescrição.

O protocolo de avaliação aeróbia “máxima fase estável de lactato” (MFEL), considerado na atualidade o padrão ouro para determinação da condição aeróbia de humanos, ainda não havia sido testado em animais submetidos à corrida em esteira rolante. Na tentativa de eliminar essa lacuna, efetuamos a adaptação desse método à avaliação de ratos corredores (ESTUDO 1). Nesse estudo, após cuidadosa seleção e adaptação de ratos corredores, submetemos os animais a exercício contínuo em distintas velocidades, por 25 minutos. Com a extração de amostras sanguíneas a cada cinco minutos de exercício foi possível a obtenção de curvas lactacidêmicas para cada uma das intensidades. A velocidade associada à MFEL foi 20m/min, com o metabólito

permanecendo estável em $3,9 \pm 0,3$ mmol/L. A concentração lactacidêmica sanguínea apresentou resposta similar à observada em humanos, submetidos ao mesmo procedimento de avaliação (Heck et al, 1985; Billat et al., 1995; Beneke et al., 1996). Desse modo, o primeiro conjunto de resultados obtidos sugere que o teste de MFEL parece ser bem aplicado à avaliação aeróbia de ratos, em exercício de corrida.

Durante a execução do estudo 1, surgiu-nos uma dúvida acerca da concentração de lactato associada à máxima intensidade de exercício aeróbio. É comum observarmos prescrição de treinamento para humanos baseada em valores lactacidêmicos fixos, tais com 4,0 ou 4,5mmol/L. Também já é bem estabelecido que os níveis de lactato no sangue podem apresentar variações que dependem do protocolo de exercício utilizado na avaliação ou mesmo do tipo de exercício ao qual o indivíduo é submetido. Como nosso foco de estudo é o rato, investigamos a possibilidade de ergômetro dependência nas concentrações de MFEL de lactato, já que esse protocolo é utilizado em todo o nosso projeto como método de validação de nossas avaliações invasivas e não-invasivas (ESTUDO 2).

O estudo 2 verificou que, da mesma forma com que é observado em humanos, há uma real ergômetro-dependência das concentrações de lactato sanguíneo na MFEL de ratos. Em corrida na esteira, a concentração média de lactato nessa intensidade é 4mmol/L, similar à encontrada em avaliações de corrida executadas com humanos. Já na natação, a lactacidemia apresenta estabilização em valores superiores (5,5 mmol/L), distintamente do ocorrido com nadadores humanos, para os quais a concentração de lactato sanguíneo em intensidade de MFEL parece ser aproximadamente 3,5mmol/L (Pereira et al., 2001). Esse resultado infere sobre a necessidade de cautela na prescrição de intensidade de exercício com base em concentrações fixas de lactato e confirma a ergômetro-dependência da MFEL também em ratos.

Os dois trabalhos supracitados foram executados em esteira rolante e são invasivos, auxiliando-nos significativamente na caracterização da intensidade de exercício nesse ergômetro e minimizando possíveis erros importantes nas próximas padronizações. Essa ordem na execução dos estudos foi fundamental, já que em nosso grupo ainda não havíamos trabalhado com avaliação de ratos corredores, diferente da natação, já bem esclarecida em nosso laboratório.

O terceiro estudo apresentado consistiu na adaptação de um protocolo não exaustivo e com mensuração do lactato sanguíneo, inicialmente sugerido para avaliação da capacidade aeróbia de humanos. Esse trabalho validou o método de duplos esforços de exercício submáximo como um teste capaz de determinar individualmente a condição aeróbia de ratos Wistar em natação. A vantagem desse procedimento encontra-se na característica não exaustiva dos esforços e na independência da cinética de lactato sanguíneo. Os resultados encontrados foram promissores e significantes, já que a carga crítica determinada pelo delta nulo de lactato, obtido através da interpolação linear de todos os deltas ($4,80 \pm 0,20\%$ do pc) foi igual à intensidade equivalente à máxima fase estável de lactato dos animais ($5,20 \pm 0,10\%$ do pc). A igualdade desses parâmetros garante a efetividade do protocolo proposto para a avaliação da capacidade aeróbia dos ratos nadadores.

No estudo 4, a proposta foi utilizar um método não invasivo, porém exaustivo, para determinação de parâmetros aeróbio e anaeróbio em natação de ratos. Nesse trabalho ainda foram observados os efeitos da depleção prévia de glicogênio muscular, promovida por 12 horas de jejum, na determinação desses parâmetros. Diferente dos resultados obtidos no terceiro experimento (ESTUDO 3), a carga crítica estimada de maneira não invasiva foi inferior à máxima fase estável de lactato, que foi observada a 80% de Ccrit.

Um outro aspecto importante observado no estudo 4 refere-se à alteração do parâmetro anaeróbio proposto pelo modelo matemático (CTA), com a realização dos experimentos após 12 horas de jejum. Houve uma redução significativa na CTA, correspondente à inclinação da reta de regressão na modelagem linear sugerida pelo estudo, sem modificação no intercepto-y da reta. Dessa maneira, apenas o parâmetro anaeróbio foi alterado, sem interferência na capacidade aeróbia dos ratos (C_{crit}).

Ainda no estudo 4 é importante ressaltar que o jejum fisiológico reduziu o glicogênio muscular e hepático, porém, após exercício exaustivo, ratos jejuados apresentaram valores elevados dessa reserva. Isso fortalece a idéia de que a CTA necessita de mais investigações, pois parece representar um estado de equilíbrio para o trabalho anaeróbio e não um estoque monocompartimental de energia, como sugerido pela literatura.

A concentração de lactato sangüíneo em intensidade equivalente a MFEL foi igual em ambos os estudos (3 e 4), o que garante a fidedignidade desse parâmetro. Quando comparadas, as intensidades aeróbias obtidas pelo método de duplos esforços (ESTUDO 3) e carga crítica exaustiva (ESTUDO 4), observamos diferença estatística entre esses valores. O estudo 3 forneceu maior precisão na determinação da capacidade aeróbia, já que a C_{crit} foi igual a MFEL, ao passo que no estudo 4, essa intensidade aeróbia foi superestimada. Cabe ressaltar que no estudo 3 houve a necessidade de coleta sangüínea para a determinação dos deltas lactato, tornando metodologia invasiva. O quarto trabalho foi isento de procedimento invasivo, o que explica o erro na estimativa de C_{crit} , ainda que sistemático para todos os animais (20%).

Por acreditarmos na aplicabilidade do protocolo não-invasivo de potência crítica sugerido por Monod e Scherer (1965), efetuamos também a padronização desse teste para avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos corredores. Os ratos foram submetidos à exercícios contínuos e exaustivos em intensidades supra-limiar anaeróbio. Com os registros de velocidade e tempo de

exercício até a exaustão, utilizamos um modelo matemático para estimar a máxima intensidade aeróbia (velocidade crítica – V_{crit}) e a capacidade de corrida anaeróbia (CCA) de ratos Wistar. O protocolo invasivo de MFEL foi novamente aplicado, para conferir a veracidade de V_{crit} . O modelo mostrou-se suscetível à adaptação para avaliação de ratos corredores. A V_{crit} foi identificada em 22,8m/min e a CCA, 26,81m. Quando comparadas, a intensidade de V_{crit} e MFEL (20m/min) foram diferentes, porém altamente correlacionadas. Desse modo, concluímos esse experimento acreditando na possibilidade de utilização da metodologia simples e não-invasiva para avaliação aeróbia de ratos em esteira rolante. Quanto à capacidade de corrida anaeróbia, mais investigações são necessárias para efetivas conclusões.

Assim como executado no experimento 3, adaptamos o método de Chassain de duplos esforços para a avaliação de ratos corredores (ESTUDO 6). Da mesma maneira que o ocorrido em natação, esse procedimento apresentou resultados satisfatórios e extremamente importantes para avaliação de animais em esteira rolante. Cabe ressaltar que, dentre os métodos adotados na presente tese, esse modelo de duplos esforços parece-nos muito interessante para pesquisas que envolvem animais com doenças crônico-degenerativas devido sua característica não exaustiva.

Outro aspecto que tange a pesquisa experimental são as condições laboratoriais nas quais as cobais utilizadas são submetidas, dentre eles o ciclo de luminosidade que é adotado no Biotério. De acordo com a literatura, a luminosidade é um relevante modulador extrínseco, podendo prover alterações endógenas capazes de alterar, inclusive, atividade diária e atividade física de humanos e animais. Para avaliarmos o efeito do ciclo claro-escuro na determinação da condição aeróbia e anaeróbia de ratos submetidos à exercício de corrida, utilizamos o modelo não invasivo de potência crítica aplicado à animais tratados em ciclo de luminosidade normal e ciclo de luminosidade invertido (ESTUDO 7). Segundo pressupostos teóricos do modelo de

avaliação adotado para a análise, apenas manipulações relacionadas ao treinamento físico, dieta e modificação na pressão parcial de oxigênio seriam capazes de alterar os valores de V_{crit} e/ou CCA. De acordo com os resultados obtidos e contrariando a hipótese inicial, o ciclo de luminosidade invertido ocasionou uma elevação da capacidade aeróbia dos ratos corredores sem modificar a capacidade de corrida anaeróbia. Dessa maneira, foi possível concluir no estudo 7, que há necessidade de cautela com o ritmo circadiano de roedores na prescrição de exercício em esteira rolante, especialmente devido à condição aeróbia ser melhorada quando o ciclo claro-escuro invertido é utilizado.

O último estudo apresentado na presente tese (ESTUDO 8) investigou a possibilidade de determinação do LAn em teste progressivo de natação e corrida para ratos, com a utilização de dois métodos matemáticos de análise: concentração fixa de lactato e bissegmentação da curva lactacidêmica. Esse trabalho foi fruto de contradições verificadas na literatura acerca do protocolo progressivo para avaliação do LAn em diferentes ergômetros, especialmente em pesquisas anteriores realizadas com ratos. Para execução do estudo, selecionamos os dois métodos de análise supracitados e adaptamos um teste com incremento de carga contendo características similares para a natação e corrida em esteira rolante. De acordo com os resultados encontrados, não é possível, em teste progressivo aplicado à ratos exercitados em natação, obter curvas lactacidêmicas satisfatórias. Nesse ergômetro, a melhor análise para determinar o LAn a partir de teste progressivo deve ser executada por concentração fixa de lactato na faixa de 5 à 5,5mmol/L. Já em corrida, a inspeção visual seguida por bissegmentação das retas de regressão parece ser o método mais adequado para estimar LAn de ratos Wistar.

Entendemos que nossos experimentos fornecerão ferramentas para diversas áreas de pesquisa, haja vista que cada teste proposto apresenta vantagens importantes e características

diferentes. Para alguns casos, especialmente em treinamento controlado, a utilização de procedimentos invasivos não interfere na condição do animal e a precisão é necessária, o que justifica a utilização dos protocolos invasivos propostos (ESTUDOS 1, 2, 3). Em outras condições laboratoriais, a simplicidade dos protocolos apresentados nos experimentos 4, 5 e 7 (não invasivos, porém exaustivos) supera o erro sistemático na determinação de C_{crit} e/ou V_{crit} e pequenos ajustes resultam na obtenção precisa da real intensidade aeróbia.

Cabe destacar a necessidade de cautela com aspectos importantes da experimentação animal, tal como a dieta corretamente adotada (ESTUDO 4) e o ciclo de luminosidade no qual os ratos estão inseridos (ESTUDO 7), haja vista que essas manipulações podem resultar em equívocos na avaliação e prescrição do treinamento para esses animais. Também é importante identificar o melhor método matemático empregado em análises de resultados aparentemente similares, na tentativa de minimizar erros na determinação da melhor carga de treinamento (ESTUDO 8).

Em síntese, os resultados obtidos sugerem que foi possível a padronização e utilização de protocolos invasivos e não invasivos para avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos Wistar, submetidos à exercícios de natação e corrida em esteira rolante. Os diferentes procedimentos sugeridos devem ser adotados de acordo com as condições físicas dos animais utilizados e das possibilidades do laboratório em que os experimentos serão efetuados. Para avaliação aeróbia de animais nadadores e corredores, a MFEL ainda deve ser interpretada como o método padrão ouro, porém o teste de duplos esforços não exaustivo proposto na presente tese é capaz de estimar a máxima intensidade com predominância aeróbia de maneira muito satisfatória. Em caso da impossibilidade de análise lactacidêmica, uma sugestão interessante é a utilização do

modelo exaustivo de potência crítica para avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos, já que esse método necessita apenas de um ergômetro e um cronômetro.

7. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos nessa tese, é possível concluirmos que:

- O protocolo de máxima fase estável de lactato pode ser utilizado para a determinação da intensidade de transição metabólica de ratos corredores;
- Ratos não treinados submetidos à exercícios contínuos de corrida apresentam máxima fase estável de lactato em velocidade de 20m/min, com concentração de lactato sanguíneo média de 3,9 mmol/L;
- A máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizado ratos, já que as concentrações lactacidêmicas nessa intensidade são extremamente distintas quando utilizados o exercício de natação ou a corrida em esteira rolante;
- O protocolo não exaustivo de duplos esforços ($Crit_{CH}$), inicialmente sugerido por Chassain (1986) para avaliação de humanos, é válido para determinar a condição aeróbia de ratos sedentários realizando exercício de natação (estudo 3);

- O teste não invasivo de carga crítica ($C_{crit_{MS}}$) é capaz de estimar a capacidade aeróbia de ratos apresentando um erro de 20% que, por ser sistemático, pode ser corrigido com pequenos ajustes;
- A depleção prévia dos estoques intramusculares de energia alterou o parâmetro anaeróbio proposto pelo modelo de carga crítica, sem alterar a condição aeróbia dos ratos. Isso sugere a sensibilidade do modelo matemático frente a alterações fisiológicas;
- A CTA, parâmetro anaeróbio indicado pelo método não invasivo, necessita de mais investigações;
- O modelo de potência crítica adaptado ao exercício de corrida em esteira rolante é adequado para avaliação aeróbia de ratos, mas a capacidade de corrida anaeróbia requer mais investigações;
- O protocolo não exaustivo de duplos esforços parece ser válido para avaliação aeróbia de ratos sedentários, submetidos ao exercício de corrida em esteira rolante, mesmo subestimando em 20% a intensidade equivalente à MFEL. Isso devido à sistematização dos dados, porém pequenos ajustes na intensidade de esforço são necessários durante a execução de treinamento de corrida para ratos.
- Há a necessidade de cautela com o ritmo circadiano de roedores na prescrição de exercício em esteira rolante, especialmente devido à condição aeróbia ser maior quando o ciclo claro-escuro invertido é utilizado.

- Em relação ao protocolo progressivo para determinação do limiar anaeróbio em diferentes ergômetros, a melhor forma de análise matemática para avaliação de ratos em exercício de natação parece ser a utilização de concentração fixa de lactato na faixa de 5,0 à 5,5mmol/L, ao passo que na esteira rolante, a análise por bissegmentação da curva lactacidêmica individual demonstra maior viabilidade e melhor resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE

1. ALMARWAEY, O. A.; JONES, A. M.; TOLFREY, K. Maximal lactate steady state in trained adolescent runners. **J Sports Sci**, v.22(2), p.215-25. 2004
2. AZEVEDO, L.F.; BRUM, P.C.; MATTOS, K.C.; JUNQUEIRA, C.M., RONDON, M.U.P.B.; BARRETO, A.C.P.; NEGRÃO, C.E. Effects of losartan combined with exercise training in spontaneously hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v.36(11), p.1595-1603, 2003.
3. BALDARI, C.; GUIDETTI, L. A simple method for individual anaerobic threshold as a predictor of maximal lactate steady state. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.1798-802, 2000.
4. BAUMGART, P.; WALGER, P.; FUCHS, G.; VON EIFF, M.; RAHN, K.H. Diurnal variations of blood pressure in shift workers during day and night shift. **Int Arch Occup Environ Health**, v.61, p.463-6, 1989.
5. BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc**, v.27(6), p.863-7, 1995.
6. BENEKE R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v. 89, p.95-9, 1995.
7. BENEKE, R.; HECK, H.; SCHWARZ, V.; LEITHAUSER, R. Maximal lactate steady state during the second decade of age. **Med Sci Sports Exerc**, v.28, p.1474-8, 1996.

8. BENEKE, R.; VON DUVILLARD, S. Determination of maximal lactate steady state response in selected sports events. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.28, p.241-243, 1996.
9. BENEKE, T. Maximal lactate steady state concentration (MLSS): experimental and modelling approaches. **Eur J Appl Physiol**. v.88, p.361-9, 2003.
10. BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, v.89, p.95-9, 2003.
11. BENNEL, K.L.; KHAN, K.M.; WARMINGTON, S.; FORWOOD, M. R.; COLEMAN, B.D.; BENNETT, M.B.; WARK, J.D. Age does not influence the bone response to treadmill exercise in female rats. **Med Sci Sports Exerc**. v.34, p.1958-65, 2002.
12. BENTLEY, D.J., MCNAUGHTON, L.R. Circadian rhythms in blood lactate concentration during incremental ergometer rowing. **Eur J Appl Physiol**, v.92, p.69-74, 2004.
13. BERTHOIN_S.; BAQUET G.; DUPONT G.; VAN PRAAGH E. Critical velocity during continuous and intermittent exercises in children. **Eur J Appl Physiol**. v.98(2), p.132-8, 2006.
14. BILLAT, V. Détermination d'une puissance critique aérobie par l'a évolution de la lactatémie en régime continu d'exercice musculaire. **Science et Motricité**, v.16, p.3-11, 1992.
15. BILLAT, V. L.; DALMAY, F.; ANTONINI, M. T. A method for determining the maximal steady state of blood lactate concentration from two levels of submaximal exercise. **Eur J Appl Physiol**, v.69, p.196-202, 1994.

16. BILLAT, V. L.; GRATAS-DELAMARCHE, A.; MONNIER, M.; DELAMARCHE, P. A test to approach maximal lactate steady-state in 12-years old boys and girls. **Arch Physiol Biochem**, v.103, p.65-72, 1995.
17. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v.33(6), p.407-26, 2003.
18. BILLAT, V. L.; MOUISEL, E.; ROBLOT, N.; MELKI, J. Inter- and intra-strain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol**, v.98(4), p.1258-63, 2005.
19. BISHOP, D.; JENKINS, D.G. The influence of recovery duration between periods of exercise on the Critical Power function. **Eur J Appl Physiol**, v. 2, p.15-20, 1995.
20. BISHOP, D.; JENKINS, D.G.; HOWARD, A. The critical power function is dependent on the duration of predictive exercise tests chosen. **Int J Sports Med**, v.19, p.125-129, 1998.
21. BODNER, M.E., RHODES, E.C., MARTIN, A.D., COUTS, K.D. The relationship of the heart rate deflection point to the ventilatory threshold in trained cyclists. **J Strength Cond Res**. v.16, p.573-80, 2002.
22. BRAGA, L.R.; MELLO, M.A.R.; MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A. Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e destreinamento sobre o peso corporal e metabolismo muscular de ratos obesos. **Rev Port Cienc Desp**, v. 6, p. 160-169, 2006.
23. BRICKLEY, G.; DOUST, J.; WILLIAMS, C.A. Physiological responses during exercise to exhaustion at critical power. **Eur J Appl Physiol**, v.88, p.146-151, 2002.

24. BROOKS, G. A. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.790-799, 2002.
25. BRUM, P.C.; SILVA, G.J.J; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v.36, p.10-18, 2000.
26. BULBULLIAN, R.; JEONG, J.; MURPHY, M. Comparison of anaerobic components of the wingate and critical power tests in males and females. **Med Sci Sports Exerc**, v.28): 1336-1341, 1996.
27. CAMBRAS, T.; VILAPLANA, J.; CAMPUZANO, A.; CANAL-CORRETGER, M.M.; CARULLA, M.; DIEZ-NOGUERA. A. Entrainment of the rat motor activity rhythm: effects of the light-dark cycle and physical exercise. **Physiol Behav.**, v.70, p.227-32, 2000.
28. CARTER, H.; JONES, A.M.; DOUST, J.H. Effect of incremental test protocol on the lactate minimum speed. **Med Sci Sports Exerc**, v.31, p.837-45, 1999.
29. CARVALHO, J.F.; MASUDA, M.O.; POMPEU, F.A. Methods for diagnosis and control of aerobic training in rats based in lactate threshold. **Comp Biochem Physiol part A.**, v.140(4), p.409-13, 2005.
30. CAVALHERI, R.; GOBATTO, C.A. Correlação entre limiar anaeróbio e potência crítica. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual Paulista de Bauru, 1997
31. CHASSAIN, A. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme á l'effort: application á la mesure des puissances de la frequence cardiaque et de la lactatémie. **Science & Sports**, v.1, p.41-8, 1986.

32. CHIESA, J.J.; DIEZ-NOGUERA, A.; CAMBRAS, T. Effects of transient and continuous wheel running activity on the upper and lower limits of entrainment to light-dark cycles in female hamsters. **Chronobiol Int.** v.24(2), p.215-34, 2007.
33. COGGAN, A.R.; SPINA, R.J.; KOHRT, W.M. & HOLLOSZY, J. O. Effect of prolonged exercise on muscle citrate concentration before and after endurance training in men. **Am J Physiol**, v.264, p.E215-E220, 1993.
34. CONCONI F, FERRARI M, ZIGLIO PG, DROGHETTI P, CODECA L. Determination of the anaerobic threshold by a noninvasive field test in runners. **J Appl Physiol**, v.52, p. 869-873, 1982.
35. CONTARTEZE, RV.L.; MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comp Biochem Physiol part A** (in press) 2007.
36. DAGGAN, R. N., ZAFEIRIDIS, A., DIPLA, K., PUGLIA, C. D., GRATZ, I., CATALANO, E., KENDRICK, Z. V., 2000. The effects of chronic exercise on anesthesia induced hepatotoxicity. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.2024-8, 2000.
37. DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP R.G. **Basic and clinical biostatistic**. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.
38. DEBRAY, P., DEY, S. K. A comparison of the point of deflection from linearity of heart rate and ventilatory threshold in the determination of the anaerobic threshold in Indian boys. **J Physiol Anthropol**. v.26(1), p. 31-7, 2007.

39. DEKERLE, J.; SIDNEY, M.; HESPEL, M.J.; PELAYO, P. Validity and reliability of critical speed, critical stroke rate, and anaerobic capacity in relation to front crawl swimming performances. *Int J Sports Med*, v.23, p. 93-98, 2002.
40. DEPRÉS-BRUMMER, P, LEVI F, METZGER G, TOUITOU Y. et al. Light-induced suppression of the rat circadian system. *Am J Physiol*, v. 268, p.R1111-6, 1995.
41. DESCHENES, M.R.; KRAEMER, W.J.; BUSH, J.A.; DOUGHTY, T.A.; KIM, D.; MULLEN, K.M.; RAMSEY, K. Biorhythmic influences on functional capacity of human muscle and physiological responses. *Med Sci Sports Exerc*, v.30(9), p.1399 – 407, 1998.
42. DeVRIES, H.A.; MORITANI, T.; NAGATA, A.; MEGNUSSEN, K. The relation between critical power and neuromuscular fatigue as estimated from electromyographic data. *Ergonomics*, v.25(8), p.783-791, 1982.
43. DUBOIS B., et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-6, 1956.
44. DUMKE, C.L., BROCK, D.W., HELMS, B.H., HAFF, G.G. Heart rate and lactate threshold and cycling time trials. *J Strength Cond Res*. v.20(3), p.601-7, 2006.
45. EDMONDS, S.C.; ADLER, N.T. The multiplicity of biological oscillators in the control of circadian running activity in the rat. *Physiol Behav*. v.18(5), p.921-30, 1977.
46. FERREIRA, J.C.B; ROLIM, N.P.L.; BATHOLOMEU, J.B.; GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P.C. Maximal lactate steady state in running mice: effects of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x, 2007.

47. FORSYTH, J.J., REILLY, T. Circadian rhythms in blood lactate concentration during incremental ergometer rowing. **Eur J Appl Physiol**. v.92, p.69-74, 2004.
48. FOURNIER, P.A.; BRÄU, L.; FERREIRA, L.D.M.C.; FAIRCHILD, T.; RAJA, G.; JAMES, A.; PALMER, T.N. Glycogen resynthesis in the absence of food ingestion during recovery from moderate or high intensity physical activity: novel insights from rat and human studies. **Comp Bioch Physiol**, v.133(3), p.755-763, 2002.
49. GAESSER, G.A., CARNEVALE, T.J., GARFUNKEL, A., WLATER, D.O., WOMACK, C.J. Estimation of critical power with nonlinear and linear models. **Med Sci Sports Exerc**, v., p.1430-1437, 1995.
50. GAESSER, G.A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exerc Sports Sci Rev**, v.24, p.35-70, 1996.
51. GASKILL, S.E.; RUBY, B.C.; WALKER, A.J.; SANCHEZ, O.A.; SEREFASS, R.C.; LEON, A.S. Validity and reliability of combining three methods to determine ventilatory threshold. **Med Sci Sports Exerc**, v.33, p.1841-1848, 2001.
52. GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C. Y.; MELLO, M. A. R. 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, p.725-6, 1991.
53. 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. **Comp Biochem Physiol**, v.130A, p.21-7, 2001.

54. GOBATTO, C.A.; MANCHADO, F.B.; VOLTARELLI, F.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; MELLO, M.A.R. Non-invasive critical load determination in swimming rats: effects of muscle glycogen depletion. **Med. Sci. Sports Exerc (Suppl)**, v.37(5), p.S331, 2005.
55. GREEN, S.; DAWSON, B.T.; GOODMAN, C.; CAREY, M.F. Y-intercept of the maximal work-duration relationship and anaerobic capacity in cyclists. **Eur J Appl Physiol**, v.69, p.550-556, 1994.
56. GULLET, L.J.N.; HOUSH, T.J.; JOHNSON, G.O. A comparison between methods of measuring anaerobic work capacity. **Ergonomics**, v.33(10), p.1413-1419, 1998.
57. HARNISH, C.R.; SWENSEN, T.C.; PATE, R.P. Methods for estimating the maximal lactate steady state in trained cyclists. **Med Sci Sports Exerc**, v.33(6): 1052-55, 2001.
58. HARRI, M.; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol Scand**, v.126, p.189-97, 1986.
59. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. **Int J Sports Med**, v.6, p.117-30, 1985.
60. HILL, A. V.; LONG, C. N. H.; LUPTON, H. Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen: parts IV-VI. **Proc Roy Soc B**, v.97, p.84-138, 1924.
61. HILL, D.W. The critical power concept. **Int J Sports Med**, v.16, p. 237-254, 1993.
62. HILL, D.W.; SMITH, J.C. A method to ensure the accuracy of estimates of anaerobic capacity derived using the critical power concept. **J Sports Med Phys Fitness**, v.34, p.23-37, 1994.

63. HILL, D.; POOLE, D.; SMITH, J. The relationship between power and the time to achieve VO_{2max} . **Med Sci Sports Exerc**, v.34(4), p.709-714, 2002.
64. HINKLEY, D.V. Inference about the intersection in two-phase regression. **Biometrika**, v. 56, p. 495-504, 1969.
65. HOLLMANN, W. Historical remarks on the development of the aerobic-anaerobic threshold up to.1996. **J Sports Med Phys Fitness**, v.6, p.109-16, 1985.
66. HOUSH, J.D.; HOUSH, T.J.; BAUGE, S.M. A methodological consideration for the determination of critical power and anaerobic work capacity. **Research Quarterly For Exercise and Sport**, v.61, p.406-409, 1990.
67. HOUSH, T.J.; DeVRIES, H.A.; HOUSH, D.J.; TICHY, M.W.; SMITH, K.D.; TICHY, A.M. The relationship between critical power and onset of blood lactate accumulation. **J Sports Med Phys Fitness**, v.31, p.31-36, 1991.
68. JENESON, J.A.; DE SNOO, M.W.; VERLINDEN, N.A.; JOOSTEN, B.J.; DOORNENBA, A.; SCHOT, A.; EVERTS, M.E. Treadmill but not wheel running improves fatigue resistance of isolated extensor digitorum longus muscle in mice. **Acta Physiol** (in press).
69. JENKINS, D.G.; QUIGLEY, B.M. Blood lactate in trained cyclists during cycle ergometer at critical power. **Eur J Appl Physiol**, v.61, p.278-283, 1990.
70. JENKINS, D.G.; QUIGLEY, B.M. The y-intercept of critical power function as a measure of anaerobic work capacity. **Ergonomics**, v.34, p.13-22, 1991.

71. JENKINS, D.G.; KRETEK, K.; BISHOP, D. The duration of predicting trials influences time to fatigue at critical power. **J Sci Sports Med**, v.1, p.213-218, 1998.
72. JONES, A. M.; DOUSTY, J. H. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8Km running performance. **Med Sci Sports Exerc**, v.30, p.1304-1313, 1998.
73. JONES, A. M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Med**, v.29, p.373-6, 2000.
74. JUEL, C. Current aspects of lactate exchange: lactate/H⁺ transport in human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v.86, p. 12-16, 2001.
75. KELLIHER, P.; CONNOR, T.J.; HARKIN, A.; SANCHEZ, C.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. **Physiol Behav.**, v.69, p.531-9, 2000.
76. KEMI, O.J.; ELLINGSEN, O. Trans-sodium crocetinate does not affect oxygen uptake in rats during treadmill running. **Scand J Clin Lab Invest**. v.65(7), p.577-84, 2005.
77. KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol**, v.42, p.25-34, 1979.
78. KLEIN, D.C.; MOORE, R.Y.; REPERT, S.M. **Suprachiasmatic nucleus**. The mind's clock. Oxford University Press, New York, 1991.

79. KOKUBUN, E. Velocidade crítica como estimador do limiar anaeróbico na natação. **Rev Paulista Educação Física**, v.10, p.5-20, 1996.
80. KOLBE, T.; DENNIS, S.C.; SELLEY, E.; et al, The relationship between critical power and running performance. **J Sports Sci**, v.13, p.265-269, 1995.
81. LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.114 A, p.51-5, 1996.
82. LI, JING; STILLMAN, J.S; CLORE, J.N; BLACKARD, W.G. Skeletal muscle lipids and glycogen mask substrate competition (Randle cycle). *Metabolism*, v.42(4), p.451-456, 1993.
83. LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, v.12, p.202-209, 1998.
84. LUI, T.; BORJIGIN, J. Relationship between nocturnal serotonin surge and melatonin onset in rodent pineal gland. **J Circadian Rhythms**, v.4, p.12, 2006.
85. MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int J Sports Med**, v.7, p.45-65, 1986.
86. MANCHADO, F.B; GOBATTO, C.A.;VOLATRELLI, F.A.; CONTARTEZE, R.V.L; MELLO, M.A.R. Padronização de protocolo não exaustivo para determinação da carga crítica em modelo experimental utilizando animais. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento (supp)**, p.48., 2004.

87. MANCHADO, F.B.; NAKAMURA, F.Y.; KOKUBUN, E. Validação de Procedimento submáximo para a determinação da intensidade de potência crítica: comparações com o limiar anaeróbio. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto (supp)**, v.4(2), p.243, 2004.
88. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. **J Exerc Physiol online**, v.8, p.29-35, 2005.
89. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Máxima fase estável é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12(5), p.259-262, 2006a.
90. MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.31, p.731-736, 2006b.
91. MARANGON, L., GOBATTO, C. A., MELLO, M. A. R., AND KOKUBUN, E. Utilization of an hyperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc (Suppl)**, v.34(5):149, 2002.
92. McLELLAN, T.M.; CHEUNG, K.S.Y. A comparative evaluation of the individual anaerobic threshold and critical power. **Med Sci Sports Exerc**, v.24, p.543-550, 1992.
93. MONOD, H.; SCHERER J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics** v.8, p.329-38, 1965.
94. MORITANI, T.; NAGATA, A.; DeVRIES, H.A.; MURO, M. Critical power as a measure of physical work capacity and anaerobic threshold, **Ergonomics**, v.24, p.339-350, 1981.

95. MORTON, H.; BILLAT, V. The critical power model for intermittent exercise. **Eur J Appl Physiol**, v.91:303-307, 2004.
96. MORTON, R.H. The critical power and related whole-body bioenergetic models. **Eur J Appl Physiol**, v.96(4), p.339-54, 2006.
97. MROSOVSKY, N. Locomotor activity and non photic influence on circadian clock. **Biol Rev**, v.71, p.343-72, 1996.
98. MUJIKA, I.; CHATARD, J.C.; BUSSO, T.; GEYSSANT, A.; BARALE, F.; LACOSTE, L. Effects of training on performance in competitive swimming. **Can J Appl Physiol**, v. 20, p.395-406, 1995.
99. MURDES, J.P.; BORTEL, R.; BLANKNHIN, E.P.; ROSSIN, A.A.; GARNIER, D.L. Rats models of type 1 diabetes: genetics, environment and autoimmunity. **Ilac J**, v. 45, p. 278-91, 2004.
100. NIKOLOVSKI, S.; FAULKNER, D.L.; PALMER, T.N; FOURNIER, P.A. Muscle glycogen repletion from endogenous carbon sources during recovery from high intensity exercise in the fasted rat. **Acta Physiol. Scand**, v.157, p.427-434, 1996.
101. OLIVEIRA, C.A.M.; LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. The role of exercise on long term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Exp Physiol**, v.90, p.79-86, 2005.
102. OYONO-ENGUELLE, S.; MARBACH, J.; HEITZ, A.; OTT, C.; GARTNER, M.; PAPE, A.; VOLLMER, J.C.; FREUND, H. Lactate removal ability and graded exercise in humans. **J Appl Physiol**, v.68, p.905-11, 1990.

103. PAPOTI, M. Efeitos do período de polimento sobre performances aeróbia e anaeróbia de nadadores após ciclo experimental de treinamento. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2003.
104. PEREIRA, R.R.; ZAGATTO, A.M.; PAPOTI, M.; GOBATTO, C.A. Validação de dois protocolos de teste para determinação do limiar anaeróbio em natação. **Motriz**, v.8, p.63-8, 2002.
105. PILEGAARDI, H.; CARSTEN, J.; WIBRAND, F. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats: effects of training. **Am J Physiol**, v.264, p.E156-60, 1993.
106. PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comp Biochem Physiol**, v.106A, p.285-9. 1993.
107. PRADA, F.J.P.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.A.M; GOBATTO, C.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao LAn. **Rev Bras Ciência Mov**, v.12 (2), p.29-34, 2004.
108. PRINGLE, J. S. M.; JONES, A. M. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. **Eur J Appl Physiol**, v.88, p.214-26, 2002.
109. PYNE, D.B.; LEE, H.; SWANWICK, K.M. Monitoring the lactate threshold in work-ranked swimmers. **Med Sci Sports Exerc**, v.33(3), p. 291-297, 2001.
110. REFFINETI, R. Variability of diurnality in laboratory rodents. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**. v.192(7), p.701-14, 2006.

111. REILLY, T. Human circadian rhythms and exercise. **Crit Rev Biomed Eng.** v.18(3), p.165-80, 1990.
112. ROBERTS, D.; SMITH, D.J. Biochemical aspects of peripheral muscle fatigue: a review. **Sports Med.**, v.7, p.125-38, 1989.
113. ROTH, D.A. The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. **Med Sci Sports Exerc**, v. 23, p.925-34, 1991.
114. SCALFANI, A., Animal models of obesity: classification and characterization. **Int J Obesity**, v.8, p.491-508 ,1984.
115. SCHABORT, E.J.; KILLIAN, S.C.; GIBSON, A.S.C.; HAWLEY, J.A. Prediction of triathlon race time from laboratory testing in national triathletes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32(2), p. 844-849, 2000.
116. SCHNEIDER, D.A.; MCLELLAN, T. M.; GASS, G.C. Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.608-613, 2000.
117. SID-ALI, B.; VANDERWALLE, H.; CHAIR, K.; MOREAUX, A.; MONOD, H. Lactate steady state velocity and distance-exhaustion time relationship in running. **Arch Int Physiol Biochim Biophys**, v. 99(4), p.297-301, 2001.
118. SJÖDIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int J Sports Med**, v.2, p.23-6, 1981.

119. SOARES, S.; VILAR, S.; BERNARDO, C.; CAMPOS, A.; FERNADES, R.; VILLAS-BOAS, J.P. Using data from the critical velocity regression line for the estimation of anaerobic capacity in infant and adult swimmers. **Rev. Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.3, p.73-118, 2003.
120. STEGMANN, H.; KINDERMANN, W.; SCHANABEL, A. Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. **Int J Sports Exerc**, v.2; p.160-5, 1981.
121. TEGTBUR, U.; BUSSE, M.W.; BRAUMANN, K. M.. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v.25, p.620-7, 1993.
122. TOUSSAINT, H.M.; WAKAYOSHI, K.; HOLLANDER, P.A; OGITA, F. Simulated front crawl swimming performance related to critical speed and critical power. **Med Sci Sports Exerc**, v.30, p.144-151, 1998.
123. VAN DEN BUUSE, M. Circadian rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in spontaneously hypertensive rats as measured with radio-telemetry. **Physiol Behav**. v.55(4), p.783-7, 1994.
124. VAN DEN BUUSE, M. Circadian rhythms of blood pressure and heart rate in conscious rats: Effects of light cycle shift and timed feeding. **Physiol Behav**, v.68, p. 9-11, 1999.
125. VANHATALO, A.; DOUST J.H.; BURNLEY M. Determination of Critical Power Using a 3-min All-out Cycling Test. **Med Sci Sports Exerc**, v.39(3), p. 548-55, 2007.
126. VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1-6, 2002.

127. WAKAYOSHI, K.; ILKUTA, K.; YOSHIDA, T.; UDO, M.; HARADA, T.; MORITANI, T.; MUTOH, Y. et al. Determination and validity of critical velocity as an index of swimming performance in the competitive swimmer. **Eur J Appl Physiol**, v.64, p.153-157, 1992.
128. WALSH, M.L. Whole body fatigue and critical power: A physiological interpretation. **Int J Sports Med**, v.29, p.153-163, 2000.
129. WASSERMAN, K.; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am J Cardiol**, V.14; P. 844-852, 1964.
130. WELTMAN, A.; SNEAD, D.; STEIM, P.; SEIP, R.; SCHURRER, R.; RUTT, R.; WELTMAN, J. Reliability and validity of a continuous incremental treadmill protocol for the determination of lactate threshold, fixed blood lactate concentrations and VO_{2max} . **Int J Sports Med**, v.11, n.1, p.26-32, 1990.
131. WINGET, C.M., DEROSHIA, C.W., HOLLEY, D.C. Circadian rhythms and athletic performance. **Med Sci Sports Exerc**, v.17(5), p.498-516, 1985.
132. YILMAZ, A.; AKSOY, A.; CANBEYLI, R. A single day of constant light (L/L) provides immunity to behavioral despair in female rats maintained on an L/D cycle. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28(8), p.1261-5, 2004.