



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**EFEITO DA LUMINOSIDADE E DO HORÁRIO DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO ATÉ A
EXAUSTÃO NA INTENSIDADE DE LACTATO MÍNIMO SOBRE RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS DE RATOS**

WLADIMIR RAFAEL BECK

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade (área de Biodinâmica da Motricidade Humana).

Janeiro - 2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**EFEITO DA LUMINOSIDADE E DO HORÁRIO DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO ATÉ A
EXAUSTÃO NA INTENSIDADE DE LACTATO MÍNIMO SOBRE RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS DE RATOS**

WLADIMIR RAFAEL BECK

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade (área de Biodinâmica da Motricidade Humana).

Orientador: Prof. Dr. CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO

Janeiro - 2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**EFEITO DA LUMINOSIDADE E DO HORÁRIO DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO ATÉ A
EXAUSTÃO NA INTENSIDADE DE LACTATO MÍNIMO SOBRE RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS DE RATOS**

WLADIMIR RAFAEL BECK

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade (área de Biodinâmica da Motricidade Humana).

Comissão examinadora

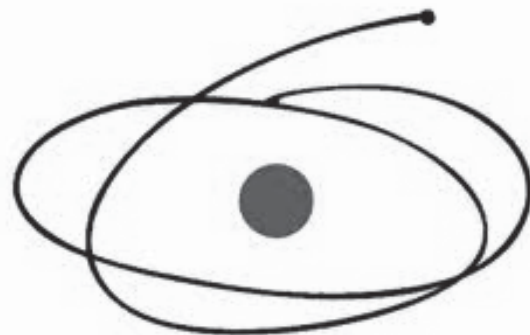
Dr. Claudio Alexandre Gobatto
Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva
Dr. Marcelo Papoti

Rio Claro – SP, 27 de janeiro de 2012.

APOIO FINANCEIRO



PROCESSO #2010/13377-7



C A P E S

Dedicatória

Dedico esta dissertação a Waldemiro Rudy
Beck, meu pai.
(in memoriam, † 07 dez 2010).

AGRADECIMENTOS

Waldemiro Rudy Beck. Local onde o trabalho, honestidade e simplicidade habitavam em harmonia com um coração gigantesco e alegre. *“Amor de Família é a coisa mais inexplicável do mundo, nem um pai consegue dizer para um filho o quanto o ama, nem o filho sabe dizer ao pai, então eles simplesmente demonstram (Pasini)”*. Assim sempre foi. Assim sempre será.

A Alaide Cagliari Beck, pelo exemplo de trabalho, dedicação, amor, persistência, fé! Por sonhar e não se deixar abater pelas adversidades, se tornando um exemplo irrefutável (a palavra convence, o exemplo arrasta!). Por começar os estudos em educação física depois dos 60 anos de idade e hoje apresentar com “um sorriso até as orelhas” sua carteirinha do CREF. Ter uma mãe assim não é pra qualquer um, sei bem disso. *“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo. (Fernando Pessoa)”*. Fernando Pessoa que me desculpe, mas essa frase é dela!

A Waldirene e Walquíria Beck, que sempre me motivaram muito e foram exemplo em diversas ocasiões. Quando se constata que formam minha família, a citação de adjetivos se tornaria prolixa. *“É, em grande parte, no seio das família que se prepara o destino das nações.” (Papa Leão XIII)*.

A Patrícia, responsável pelo apoio emocional e afetivo, sempre pronta para disparar palavras de incentivo e ser ótima companhia para todos os momentos, inclusive os de descontração, tão necessários para que as baterias voltem “full charge” na segunda feira. A sua família, que me acolheu realmente como um filho, se tornando mais uma família para mim.

Ao Professor Claudio, amigo e orientador. Lidera um laboratório cujo ambiente de trabalho reflete perfeitamente sua forma de condução. Diante de sua preocupação em proporcionar as melhores condições a seus alunos, interpreto que o dever mínimo do aluno é lutar com abnegação e comprometimento, fazendo valer todos os anos de sua vida que foram voltados para que tivéssemos as condições de trabalho que temos atualmente. Dizem que amizade não se agradece, logo, os agradecimentos são pela oportunidade oferecida e pelo tempo despendido na contribuição de minha formação acadêmica.

Aos amigos que auxiliaram em minhas coletas, em especial no momento em que mais precisei por conta de problemas pessoais. Amigos de verdade se fazem em momentos de dificuldade. Nunca esquecerei o empenho desses amigos naquele momento. Muito obrigado!

Aos professores que compuseram a banca de avaliação de qualificação e defesa dessa dissertação. Apesar dos diversos entraves administrativos, aulas e suas relevantes produções em andamento, disponibilizaram um precioso tempo para a leitura e crítica dessa dissertação.

A todos os demais professores os quais um dia tive a oportunidade de assistir alguma disciplina na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE, 2000-2001), Faculdade Assis Gurgacz (FAG, 2002), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS, 2003-2005) ou na Universidade Gama Filho (UGF, 2007), na graduação ou pós.

Especial agradecimento ao Prof Dr Alessandro Moura Zagatto, orientador do trabalho de conclusão da graduação em 2004-2005 (e hoje um grande amigo) que me despertou a curiosidade científica e proporcionou o link com a UNESP e com o Prof Claudio. Buscarei recompensá-lo fazendo o possível para me tornar um bom professor/pesquisador. Sou eternamente grato! *“Um professor influi para a eternidade; nunca se pode dizer até onde vai a sua influência. (Henry B. Adams).”*

Aos Professores Doutores Eduardo Kokubun, Maria Alice Rostom de Mello e Eliete Luciano pela enorme contribuição em minha formação acadêmica e a seus orientandos pela convivência, discussões e também pelos momentos de descontração.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências da Motricidade, especialmente a Professora Lilian, pelas experiências administrativas vividas como membro do conselho e pelos auxílios financeiros para a participação em congresso e compra de kit bioquímico para análise.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e a Fundação de amparo a pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento no primeiro e segundo anos de mestrado, respectivamente.

Aos técnicos de laboratório da UNESP pelas orientações e ensinamentos transmitidos em decorrência de meu experimento.

Aos colegas de república de Rio Claro (2009 e 2010) e de Limeira (2011), pela convivência, assegurando a tranquilidade necessária para a realização dos trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte dos tempos de UNESP e os atuais amigos do LAFAE/UNICAMP, que a partir das discussões e aprofundamentos nos grupos de estudos, se constituíram em importantes ferramentas que contribuíram significativamente em meu crescimento acadêmico.

Agradecer aos animais que foram utilizados em meu experimento talvez soe estranho visto que deram suas vidas para tal, no entanto, em virtude dos conhecimentos e experiências que nos proporcionaram, uma lembrança se caracteriza num ato mínimo.

A música. Magnetismo poderoso, concede um refúgio eficiente, geralmente regido pela irresponsabilidade do bom e velho rock n' roll. Apesar da "irresponsabilidade", *"Existe mais canções de amor do que qualquer outro tipo. Se canções influenciassem as pessoas, amaríamos uns aos outros (Frank Zappa)"*.

A nobre infantaria! A Associação dos Diplomados da Escola Superior de Guerra – ADESG, por me tornar Adesguiano. Ao Trigésimo Terceiro Batalhão de Infantaria Motorizada e à Nona Companhia de Guardas, tropas nas quais servi. A todos os meus ex-comandantes, pares e subordinados. Ao Exército Brasileiro, pela formação continuada ao longo dos meus oito anos na Força. Pelas experiências proporcionadas nas diversas missões das quais estive envolvido. *"A guarda morre mais não se rende!"*

A todas as "forças adversas", uma vez que *"Aquele que nos combate, fortalece nossos nervos e aguça nossas habilidades. Nosso oponente é nosso colaborador."* (Edmund Burke).

A todas as pessoas que cruzaram meu caminho durante meu período de estágio e mestrado. Prefiro não citar nomes para não cometer a injustiça de esquecer alguém. Por vezes passamos despercebido por pessoas que cruzam nossos caminhos e acabam por modificá-los drasticamente, talvez mesmo sem intencionar. Seja numa conversa informal, formal, acadêmica ou pessoal. Na convivência diária, trabalho, lazer, por meio do exemplo, influência... Meus agradecimentos finais são A Deus por tê-las colocado no meu caminho na hora e local certos, começando pela minha família. *"Amigos são aqueles que desafiaram a genética para fazerem parte da nossa família. (Moema Professor)."*

Epígrafe

“Utilizamos os animais para entender melhor as leis fundamentais da biologia. Eu adoraria que um dia não precisássemos mais conduzir experimentos com uso de animais. Creio que a maioria dos cientistas se sente da mesma forma. Se pudéssemos utilizar apenas um computador seria ótimo, mas a verdade é que não é possível. Para aprender mais sobre os seres humanos realizamos experimentação animal, controlada por leis, que garantem que elas sejam feitas de modo a causar o menor sofrimento possível. Se a sua tia está sendo tratada de câncer de mama, se suas crianças e animais estão imunizados por vacinas, se seu pai fez cirurgia do coração ou se você tem um joelho artificial, você deve tudo isso à pesquisa animal (Michael Conn).”

RESUMO

O modelo experimental com o uso de ratos tem sido largamente empregado na produção do conhecimento científico em diversos campos. O exercício físico é uma das intervenções utilizadas, sendo que atualmente, com o controle da intensidade relativa de esforço, podemos aprofundar essas investigações. Sabendo que o rato possui hábitos noturnos, algumas características cronobiológicas devem ser consideradas, como a temperatura corporal e atividade espontânea elevada no ciclo escuro do dia. Porém, investigações acerca do horário de manipulação em biotério e aplicação de testes físicos não têm levado em consideração o fator cronobiológico, assim, o objetivo da presente dissertação foi identificar se o exercício físico agudo ou a manipulação crônica de ratos em dois horários distintos do dia são capazes de influenciar a determinação da intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo (ILM), o tempo limite sob esta intensidade (TTE_{LMi}) e/ou o perfil hematológico e bioquímico de ratos submetidos a exercício de natação. Para isso, 80 ratos Wistar foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, compondo dois grupos controle (12:00 h e 20:00 h) e dois experimentais que realizaram o teste de performance (12:00 h e 20:00 h). A manipulação e testes de exercício foram aplicados no horário estipulado. Aos 90 dias de idade, todos os animais foram submetidos ao teste de lactato mínimo (TLM). Respeitado um intervalo de 48 horas, os grupos experimentais realizaram o tLM, sendo eutanasiados em câmara de CO_2 imediatamente após tal procedimento (em repouso no mesmo horário para os grupos controle). Para os testes realizados no período noturno foi utilizada uma iluminação especial, buscando a mínima influência no mínimo o ciclo circadiano dos animais. Foi extraído sangue por punção cardíaca, além de amostras do tecido muscular e hepático para as análises bioquímicas e hematológicas. Os resultados da presente dissertação estão dispostos em quatro experimentos, sendo que o primeiro testou o procedimento matemático ou não matemático de determinação da intensidade e lactacidemia correspondente ao TLM, sugerindo o ajuste polinomial de segunda ordem para tal. No experimento dois foi testada a iluminação para a aplicação de testes noturnos de natação para ratos e foi padronizado o teste de performance. A partir da análise do conteúdo de glicogênio de 10 músculos e do tecido hepático, além de uma série de análises bioquímicas em soro, foi identificado um modelo a ser aplicado em investigações que buscam o entendimento dos mecanismos envolvidos com a exaustão em exercício aeróbio. Os dois últimos experimentos apresentaram informações relevantes acerca do efeito do horário sobre a identificação da intensidade e lactacidemia correspondentes ao TLM, assim como uma análise do perfil hematológico de ratos submetidos a tal esforço. Identificamos que o período noturno é o ideal para a aplicação de testes de esforço na natação em ratos e que o perfil hematológico dos animais manipulados cronicamente durante o período diurno parece ser negativamente alterado. Os achados em relação aos aspectos cronobiológicos são expressivos e denotam a atenção que deve ser dada para estas condições em futuros estudos no modelo animal.

Palavras Chave: Natação. Ratos. Teste de Lactato Mínimo. Exaustão. Cronobiologia.

ABSTRACT

The experimental model using rats has been widely applied to scientific knowledge production in many fields. The exercise has been an interventions used, and currently, with the individual effort intensity control, we can deepen these investigations. Knowing that the rat possess nocturnal habits, some chronobiological characteristics must be considered, such as body core temperature and spontaneous activity level to be higher in the dark cycle of day. However, the time of day of exercise tests and handling have not taken into account, thus, the aim of this investigation was to identify if acute exercise or chronic handling at different times of day can influence the determination of the intensity corresponding to Lactate Minimum Test (ILM), the time to exhaustion under this intensity (TTE_{LMi}) and/or hematologic and biochemical parameters of rats submitted to swimming exercise. For this, 80 Wistar rats were randomly divided into four groups, comprising two control (12:00 h and 20:00 h) and two experimental groups (12:00 h and 20:00 h). All handling and exercise tests were performed on determined time. At 90 days old, all animals performed lactate minimum test (TLM), and 48 h after, experimental groups performed the tLIM, being euthanized in CO₂ immediately after this procedure (at rest at the same hour for control groups). To nocturnal tests was used a special illumination, intending to cause the minimum influence on the circadian cycle of animals. Blood sample was drawn by cardiac puncture. Liver and skeletal muscle tissue samples, as blood samples, were used to perform biochemical and hematological analysis. The results are arranged in four experiments, with the first testing the mathematical or non math procedure to determining the intensity and lactatemia corresponding to the TLM, being suggested the use of second order polynomial fit. On the experiment 2, was standardized the illumination and protocol of tLIM for dark period in swimming rats. From the glycogen content of 10 muscle and liver, and some serum biochemical analysis, was identified a model to be applied in investigations about exhaustion mechanisms in aerobic exercise. The last two experiments shown relevant information for time of day effect on the intensity and lactatemia identification corresponding to TLM, as well as an analysis of hematological profile of rats submitted to this effort. Was identified that dark period is the ideal time of day to perform swimming exercise tests for rats and that the hematological profiles of rats chronically handled during the day seems to be negatively altered. These finds in relation to chronobiological aspects are significant and denote the attention that should be given to these conditions in future studies using animal models.

Keywords: Swimming. Rat. Lactate Minimum Test. Exhaustion. Chronobiology.

LISTA DE ABREVIATURAS

ILM	Intensidade de lactato mínimo
TTELMi	Tempo de exaustão sob intensidade de teste de lactato mínimo
TLM	Teste de lactato mínimo
Lux	Unidade de intensidade luminosa
ZT	<i>Zeitgeber time</i>
NSQ	Núcleo supra quiasmático
nm	Nanômetro
W	Watt
$\mu\text{W}/\text{cm}^2$	Unidade de intensidade luminosa relacionada a irradiância luminosa
PACAP	Peptídio ativador da adenilato ciclase hipofisária
NPY	Neuropeptídeo Y
RPM	Rotações por minuto
6-SMT	6-sulfatoximetalonina
n-acetil-5-metoxitriptamina	Hormônio melatonina
h	Hora
° C	Celsius, unidade de temperatura

K	Kelvin – unidade para grandeza de temperatura termodinâmica
%PC	Percentual do peso corporal
k ₃ EDTA	Agente anticoagulante
μL	Microlitros
RDW	Red cell distribution width
mg	Miligramas
mL	Mililitros
KOH	Hidróxido de potássio
N	Newton – unidade de medida de força
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
LMT _i	<i>Intensity of lactate minimum test</i>
LMT _{LAC}	<i>Lactatemia of lactate minimum test</i>
%bw	<i>body weight percent</i>
mM	Milimolar
VI	<i>Visual inspection</i>
f_{POLY}	<i>Second order polynomial function</i>
f_{SPL}	<i>Spline function</i>
MLSS	<i>Maximal lactate steady state</i>

MAC	<i>Maximal aerobic capacity</i>
TTE	<i>Time to exhaustion</i>
TTE _{MAC}	<i>Time to exhaustion at MAC</i>
ALB	<i>Albumin</i>
CREAT	<i>Creatinine</i>
TP	<i>Total protein</i>
UA	<i>Uric acid</i>
FFA	<i>Free fat acid</i>
GLUC	<i>Glucose</i>
GLU	Gluteus maximus
BF	Biceps femoris
SO	Soleus
SM	Semimembranosus
VL	Vastus lateralis
ST	Semitendinosus
VM	Vastus medialis
RF	Rectus femoris
GTN	Gastrocnemius
p	Nível de significância estatística

R^2	Coeficiente de determinação
F	Valor estatístico do teste de análise de variância
%DG	<i>Percentage depletion of glycogen</i>
d	Dias
s	Segundos
%S	<i>Success rate</i>
ES	<i>Effect Size</i>
WBC	<i>White blood cells</i>
RBC	<i>Red blood cells</i>
Hb	<i>Hemoglobin</i>
Hct	<i>Hematocrit</i>
MCV	<i>Mean Corpuscular Volume</i>
MCH	<i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>
MCHC	<i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
Lymp	<i>Lymphocytes</i>
Mono	<i>Monocytes</i>
Neutr	<i>Neutrophils</i>
mmol/L	Milimols por litro

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO.....	16
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 – Luminosidade e sua percepção: ritmo circadiano e “relógio biológico”	22
2.2 – Cronobiologia e exercício.....	27
3 – JUSTIFICATIVA.....	33
4 – OBJETIVOS.....	35
4.1 – Objetivo geral.....	35
4.2 – Objetivos específicos.....	35
5 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1 – Amostra.....	36
5.2 – Procedimentos gerais.....	36
5.3 – Iluminação.....	37
5.4 – Procedimentos de adaptação ao meio líquido e testes aquáticos.....	38
5.4.1 – Teste de lactato mínimo.....	39
5.4.2 – Teste de performance.....	40
5.4.3 – Obtenção de material biológico.....	41
5.4.4 – Procedimentos analíticos.....	41

5.4.5 – Tratamento estatístico.....	43
6 – RESULTADOS.....	44
7 – DISCUSSÃO.....	45
8 – CONCLUSÃO.....	48
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
10 – APÊNDICES.....	59
10.1 – APÊNDICE 1. Methods of exercise intensity and lactatemia determination in lactate minimum test in rats.....	59
10.2 – APÊNDICE 2. Time-to-exhaustion at maximal aerobic capacity in rats: glycogen-based study of fatigue.....	68
10.3 – APÊNDICE 3. Time to exhaustion at lactate minimum intensity is greater in the dark period in swimming rats	81
10.4 – APÊNDICE 4 Handling and exercise at lactate minimum intensity performed until exhaustion on hematological parameters: time of day effect	93

1. INTRODUÇÃO

A produção de conhecimento científico a partir do modelo animal possui um papel fundamental nas ciências médicas e biológicas no sentido de desenvolver ou aprimorar o tratamento de diversas patologias que acometem o ser humano, possibilitando investigações mais invasivas e complexas em relação ao modelo humano. Neurocientistas, psicólogos, farmacologistas, cientistas da motricidade, fisiologistas e biólogos, dentre outros pesquisadores têm utilizado diferentes espécies de animais em seus experimentos, nos quais o rato se destaca por trazer consigo diversas vantagens quanto ao manuseio e manutenção em biotérios com baixo custo financeiro e possibilitando grande número de animais em pequenos espaços físicos, além do controle dos fatores ambientais, monitoração de parâmetros fisiológicos e verificação de alterações moleculares no sentido de tornar o modelo experimental mais adequado e estável a cada condição experimental. Outra vantagem deste modelo é a variedade de procedimentos e intervenções possíveis, dos quais o exercício físico faz parte.

Em meados da década de 1960 foi dado início aos estudos envolvendo o exercício de natação e ratos (MCARDLE & MONTROYE, 1966), sendo que os conhecimentos acerca da quantificação relativa de intensidade e individualização da prescrição do esforço para estes animais permaneceram visivelmente estagnados por algumas décadas. No início da década de noventa, Gobatto et al. (1991) investigaram a utilização de um procedimento incremental utilizando a natação como ergômetro para ratos, não obtendo sucesso na determinação do limiar anaeróbio por conta da resposta cinética do lactato em função da intensidade, no entanto, dando início e contribuindo significativamente para o avanço deste campo de pesquisa. Recentemente, protocolos de avaliação do desempenho físico foram lapidados para sua utilização em esteira (PILLIS et al., 1993; MANCHADO et al., 2005; FERREIRA et al., 2007; CONTARTEZE et al., 2008) e natação (GOBATTO et al., 2001, 2009; VOLTARELLI et al., 2002; de ARAUJO et al., 2007), possibilitando o avanço no conhecimento referente ao controle fidedigno da intensidade de esforço na qual os animais são submetidos. Assim, o exercício físico passa a compor o *roll* de intervenções objetivas e pode ser aplicado de maneira sistematizada para o tratamento de patologias como fator interveniente principal, como componente da estratégia de tratamento, ou com o objetivo de ascensão da *performance*. Esta

última condição abre uma gigantesca porta para investigações que dependem exclusivamente de procedimentos demasiadamente invasivos, inviáveis em atletas altamente treinados.

Conhecendo o atual estado da arte outras preocupações vêm à tona, como o fato de o rato possuir hábitos noturnos e características biológicas (visuais e cronobiológicas, por exemplo) distintas em relação ao ser humano (ANDERSEN et al., 2004). Essas diferenças são objeto de estudo da cronobiologia: ciência que investiga as características temporais que organizam o ser vivo, identificando e quantificando os mecanismos temporais biológicos (HALBERG et al., 1977). Explicitando a complexidade do tema, sabe-se que nem todos os fenômenos fisiológicos podem ser explicados por uma simples inversão de período cronobiológico do rato em relação ao humano, pois os sistemas fisiológicos podem responder de diferentes maneiras a um estímulo ambiental idêntico, de acordo com a hora do dia (CIPOLLA-NETO, 1991).

A luz é o mais importante sinal do ambiente capaz de induzir alterações cronobiológicas e no ritmo circadiano, estimulando alterações comportamentais e fisiológicas diversas (CLOUGH, 1987). Pequenos períodos de luz são capazes de influenciar o ritmo circadiano do rato (SUN et al., 1993). Um pulso de um minuto de duração (150 lux) pode reduzir 30% da atividade da n-acetil transferase da glândula pineal de ratos se aplicada no período escuro (ILNEROVÁ et al., 1979), sem maiores alterações quando aplicada no período claro (MURPHY et al., 1994). Apesar de a literatura atual apontar um consenso dessa influência luminosa sobre o ritmo circadiano, o processo de captação e interpretação da luz inicia com sua passagem pelo sistema sensorial de visão do rato, o qual apresenta certas peculiaridades. Primeiros estudos nesta área indicaram que ratos albinos seriam incapazes de diferenciar o comprimento das ondas espectrais luminosas, levando os pesquisadores a manipular os animais sob luz vermelha, caracterizada por energia espectral que se acreditava não ser captada pelo rato (FINLEY, 1959; FALL, 1974). Porém, recentes estudos empregando eletrorretinograma e análises comportamentais têm demonstrado que estes animais são altamente sensíveis à luminosidade, visto que possuem uma visão baseada em bastonetes (JACOBS et al., 2001), apesar disso, veremos que ainda assim carregam consigo uma visão capaz de diferenciar cores.

A luminosidade também influencia o período de sono do rato, que acontece em aproximadamente 62% durante o ciclo claro (VAN LUIJTELAAR & COENEN, 1983), período onde são registrados os mais baixos índices de temperatura corporal (TANAKA et al., 1990), contudo, inúmeros estudos insistem em realizar testes durante este período, geralmente por conveniência, simplesmente desconsiderando este contexto. Condição semelhante seria realizar todos os procedimentos metodológicos de um experimento para humanos durante a madrugada e afirmar que resultados idênticos seriam encontrados caso os testes fossem realizados em qualquer outro horário do dia. Importante ressaltar a capacidade de adaptação a tais condições experimentais, cuja atenção nem sempre é condizente. Além disso, é fato que nem todos os parâmetros fisiológicos do ser vivo são influenciados pelo ritmo circadiano, contudo, quando negligenciamos essa condição sem conhecimento prévio corremos com a possibilidade de produzirmos sérios comprometimentos à fidedignidade dos achados. Tal afirmação se baseia em estudos anteriores que apontam que ratos com privação de sono podem sofrer modulações na temperatura corporal e gasto energético (EVERSON et al., 1989; EVERSON, 1995), hormônio do crescimento (SPATH-SCWALBE et al., 1995), corticosterona (LEPROULT et al., 1997) e estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2002). Com isso, surgem perguntas, como: Avaliar cronicamente os animais durante seu período de sono poderia gerar alguma influência sobre sua *performance*? E sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos? Adaptar-se-iam os animais a tais condições?

Seguindo a tendência de diversas variáveis bioquímicas, a *performance* esportiva parece ser influenciada por variações circadianas em humanos (ATKINSON & REILLY, 1996; DRUST et al., 2005; REILLY & WATERHOUSE, 2009), sendo geralmente o período da tarde o ideal para o atingimento de melhores respostas quando comparado com o período da manhã (ATKINSON et al., 1994). Contudo, não existem investigações nesse âmbito envolvendo o modelo animal e controle fidedigno da intensidade de esforço.

Com o objetivo de aprofundar os conhecimentos sobre exercício e cronobiologia, dados referentes à execução de um desenho experimental robusto, com avaliação e prescrição individual da intensidade do exercício em diferentes horários e estrito controle da iluminação, serão apresentados e discutidos em forma de artigos. Investigaremos a influência cronobiológica sobre a determinação da

intensidade de transição aeróbia/anaeróbia e sobre a *performance* (exercício realizado até a exaustão sob tal intensidade), analisando e discutindo a interação desses efeitos (horário e exercício) sobre variáveis metabólicas, bioquímicas e hematológicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Além das características apresentadas na introdução deste documento, é relevante destacar que grande parte da atividade locomotora voluntária do rato na roda de atividades ocorre no período noturno (aproximadamente 74%) (IKEDA et al., 2000), assim como os momentos de alta temperatura corporal (TANAKA et al., 1990) e ingestão hídrica e alimentar (JOHNSON & JOHNSON, 1990), enquanto aproximadamente 62% do tempo total de sono acontecem durante o ciclo claro (VAN LUIJTELAAR & COENEN, 1983). A figura 1 ilustra algumas das variáveis que são influenciadas pelo ritmo circadiano de ratos, produzida a partir de uma adaptação dos resultados de Ikeda et al. (2000), Tanaka et al. (1990), Johnson & Johnson (1990) e Detanico et al. (2010) considerando o *zeitgeber time* (termo utilizado na cronobiologia para marcar o início de um período por meio de um sincronizador externo que influencia no meio interno, sendo neste caso considerado o ligar das luzes no biotério como *zeitgeber time zero*) utilizado em cada experimento.

Gander & Moore-Ede (1983) postularam que as alterações de luminosidade possuem papel mais importante no ritmo circadiano quando comparadas com variações de temperatura ambiente, corroborando com Filgueiras (2006), que afirmou que o principal ritmo utilizado para a sincronização com o meio ambiente é o ciclo claro-escuro, também chamado de fotoperíodo. Fuller et al. (2008) afirmaram, por meio de uma comunicação junto a revista Science, a grande importância da luminosidade na ritmicidade circadiana, argumentando que na plena disponibilidade da alimentação, o ciclo claro-escuro é o mais poderoso sincronizador circadiano. A ritmicidade circadiana da temperatura corporal de ratos deixa clara a relação entre o ciclo claro escuro e esta variável. Nos períodos de escuridão o animal apresenta elevadas temperaturas corporais quando comparados com horários de maior luminosidade, ocorrendo um aumento abrupto desta variável cerca de duas horas após o desligar das luzes em biotério (TANAKA et al., 1990).

Inúmeros estudos têm buscado analisar combinações nos períodos de luminosidade e escuridão e sua influência no ritmo circadiano (USUI et al., 2000; 2003), com o intuito de investigar o comportamento social (LAX et al., 1998; MARTINEZ et al., 2005), aprendizagem em ratos (VALENTINUZZI et al., 2001), o

ritmo circadiano da atividade locomotora voluntária diária (CHIESA et al., 2005), em variáveis como ingestão hídrica (JOHNSON & JOHNSON, 1990; 1991),

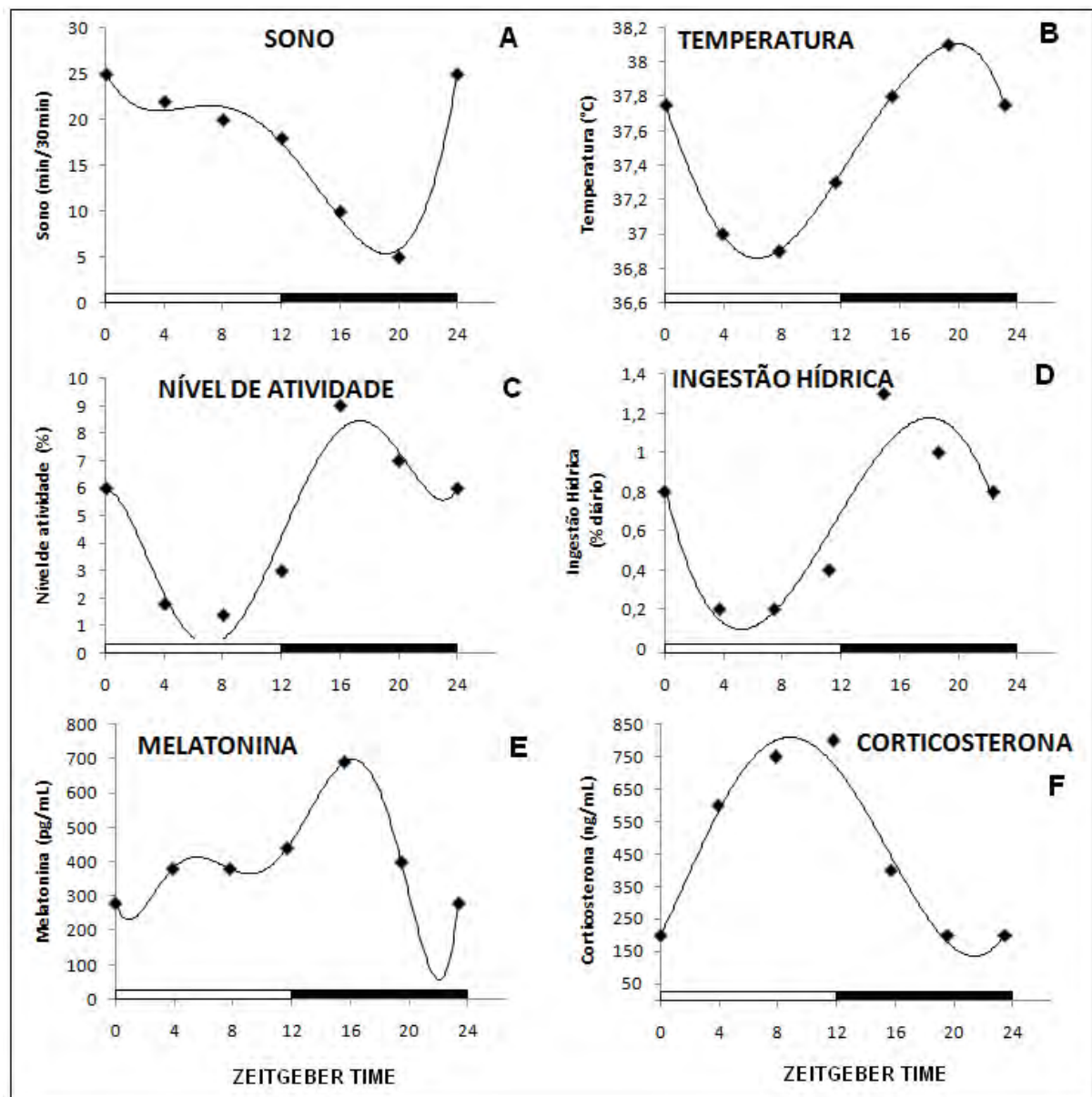


Figura 1. Ilustração da variação circadiana do sono (A - IKEDA et al., 2000), temperatura corporal (B - TANAKA et al., 1990), nível de atividade (C - IKEDA et al., 2000), ingestão hídrica (D – JOHNSON & JOHNSON, 1990), melatonina (E – DETANICO et al., 2010) e corticosterona (F – DETANICO et al., 2010) de ratos mantidos em ciclo claro escuro 12/12 hs, adaptado conforme o *zeitgeber time* de cada estudo citado. O *zeitgeber time* foi o início do período luminoso. A linha negra sobre o eixo y corresponde ao período noturno, enquanto a linha branca representa o período claro (ciclo 12/12 hs).

alimentar (OTTENWELLER et al., 1989), ritmicidade urinária (POULIS et al., 1985), alterações nos padrões de ovulação (McCORMACK & SONTAG, 1980), de

secreções hormonais como melatonina e tireotropina (REETH et al., 1994), hormônio tireoideano (HERWIG et al., 2009), no padrão imunológico (PRENDERGAST et al., 2008), por vezes incluindo no desenho metodológico lesões induzidas em estruturas cerebrais de ratos (ESKES et al., 1984), expressão gênica (VOSKO et al., 2009; ELLIS et al., 2008) ou ainda em estudos analisando o ritmo circadiano de luminosidade, sono e *performance* em astronautas (DJIK et al., 2001).

Buscaremos em dois tópicos aprofundar as informações já transmitidas por ocasião da introdução deste documento, embazando o desenho experimental desta dissertação.

2.1. Luminosidade e sua percepção: ritmo circadiano e o “relógio biológico”

Enorme quantidade de variáveis fisiológicas apresenta flutuações conhecidas por uma ritmicidade circadiana que pode ser alterada por fatores ambientais, tais como a luminosidade, promovendo modificações endógenas. Essa ritmicidade tem sido verificada através de monitorações longitudinais que mostram o espectro de significantes e recorrentes variações diárias em períodos distintos (IKONOMOV et al., 1998). Segundo estes pesquisadores o uso do termo “circadiano” reflete o contexto de que sob observação permanente do ambiente, modificações endógenas ocorrem de maneira livre no organismo em um período próximo, entretanto distinto, de 24 horas.

Apesar dos diversos estudos desenvolvidos desde a descoberta da existência de ritmicidade nas atividades de mamíferos (RICHTER, 1922; *apud* RUSAK & ZUCKER, 1979), até a década de 60 pouco foi agregado em conhecimento científico sobre os mecanismos de controle. Estudos nesse campo cresceram exponencialmente a partir da década de 1970, quando Moore & Eichler (1972) e Stephan & Zucker (1972) identificaram no diencéfalo o núcleo supraquiasmático (NSQ, localizado bilateralmente no terceiro ventrículo do hipotálamo, acima do quiasma óptico) como sendo o possível responsável pela oscilação circadiana em mamíferos. Assim, Rusak & Zucker (1979) entenderam que estando estabelecido o consenso de que o ritmo circadiano é influenciado pelo ciclo claro escuro, a descrição do processo de transdução e da determinação das vias pelas quais a informação fótica acessa os marcadores centrais passaram a ser o grande objetivo dos neuro cientistas. Com a visível importância que o ritmo circadiano apresentava,

Schwartz et al. (1983) estudaram vários tecidos de ratos, macacos e gatos, buscando gerar persistência desta ritmicidade *in vitro*. Neste estudo, os autores analisaram o uso da glicose pelo NSQ e verificaram que alguns processos bioquímicos responsáveis pela modulação da atividade circadiana do organismo são similares, mesmo em mamíferos que apresentam diferentes padrões de expressão da ritmicidade circadiana.

Apesar das diversas investigações e do conhecimento adquirido até o final da década de 80, Ralph et al. (1990) permaneceram investigando o NSQ por meio de transplantes dessa estrutura em ratos de diferentes características circadianas, o que lhes possibilitou verificar modificações nos padrões rítmicos no período pós-operatório. Com este estudo, concluíram que o NSQ possui de fato uma posição muito alta na hierarquia do controle circadiano de mamíferos. Corroborando com estes estudos, Harrington et al. (1993) promoveram lesões em porções do NSQ e postularam que essas pequenas estruturas são definitivamente necessárias para a expressão de ritmicidade circadiana em ratos. Solberg et al. (1999) complementam que a geração de ritmos circadianos que controla nosso “relógio biológico” é de responsabilidade do NSQ, que por meio da recepção de informações de luminosidade advindos da retina controla a maioria dos ritmos periféricos biológicos do organismo. Hoje se sabe que a luminosidade é captada pela retina e absorvida por um pigmento fotossensível denominado melanopsina, cujos axônios ativam os neurônios do NSQ (LENT, 2010), conforme ilustrado pela figura 2. Desta forma as aferências que chegam ao NSQ são capazes de gerar um ritmo relacionado ao ciclo claro-escuro geofísico.

Observando que o caminho entre a percepção do ambiente luminoso e sua captação pelo sistema nervoso passa pela retina, devemos considerar algumas características específicas deste órgão/sistema no rato, animal estudado nessa dissertação. Inicialmente, estudos indicaram que ratos albinos seriam incapazes de diferenciar coloração luminosa, levando os pesquisadores a manipular os animais sob energias espectrais específicas, como a luz vermelha (FINLEY, 1959; FALL, 1974). Porém, conforme citado na introdução deste documento, investigações recentes utilizando eletrorretinograma e análises comportamentais têm demonstrado que estes animais possuem uma visão capaz de diferenciar cores (JACOBS et al., 1991; 2001).

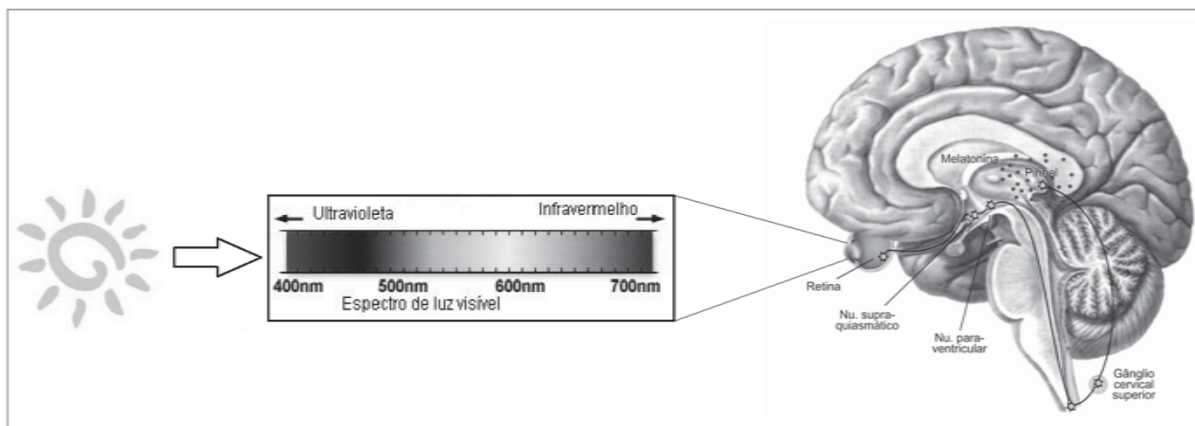


Figura 2. Esquema ilustrativo da captação da iluminação e sua influência sobre o ritmo circadiano. Fontes luminosas emitem diferentes energias espectrais, cujo espectro visível é captado. Tal informação de iluminação é absorvida pela melanopsina, que por sua vez excita os neurônios do núcleo supraquiasmático. Este, em conjunto com a glândula pineal (excitando ou inibindo a secreção do hormônio melatonina), realiza o controle cronobiológico (mecanismo fótico).

Os ratos são animais com hábitos noturnos e possuidores de uma visão predominantemente dependente dos bastonetes (células do olho capazes de reconhecer a luminosidade), sendo sugerida a existência de aproximadamente 1% de cones (LAVAIL, 1976; SZEL & ROHLICH, 1992) (células do olho capazes de reconhecer cores). Na retina do rato albino são encontradas duas classes de cones: uma com sensibilidade máxima perceptiva a 510 nanômetros (nm) decaindo rapidamente acima de 560 nm e o outro mecanismo ótico com sensibilidade máxima a ondas luminosas com comprimento de 360 nm (próximas da faixa ultravioleta) (KOOLHAAS, 1999; JACOBS et al., 1991; JACOBS et al., 2001). Por conta da baixa pigmentação na retina (SEMPLE-ROWLAND & DAWSON, 1987) e da visão baseada em bastonetes (JACOBS et al., 2001), ratos albinos possuem grande sensibilidade à luz clara, podendo facilmente ocorrer lesões irreversíveis causadas pela simples exposição a luminosidade por tempo e/ou intensidade suficientes para isso (SEMPLE-ROWLAND & DAWSON, 1987; DUNCAN & LAVAIL, 2010). Interessante destacar essa afirmativa, visto que estudos que investigam doenças crônicas capazes de gerar cegueira em ratos (como diatebes, por exemplo) precisam estar atentos a tal fato. Durante o experimento o animal pode ser exposto a uma carga luminosa suficiente para ocasionar a lesão, cuja associação pode ser feita à patogenia de maneira equivocada.

Os efeitos da luminosidade podem ser relacionados a aspectos como intensidade, comprimento de onda eletromagnética e duração do período de exposição (CASTELHANO-CARLOS & BAUMANS, 2009). Sabemos que um pulso luminoso com um minuto de duração (150 lux) pode reduzir até 30% da atividade da n-acetil transferase da glândula pineal de ratos caso esta iluminação seja aplicada no período noturno (ILNEROVÁ et al., 1979). Sun et al. (1993) analisaram a exposição de ratos albinos à luz vermelha em três diferentes intensidades por uma hora e compararam a secreção de melatonina com animais expostos a luz branca. Nestes experimentos os pesquisadores verificaram que com comprimentos de onda acima de 600 nm e intensidade baixa de luz (lâmpada incandescente de 15 W, gerando $170 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de irradiância) a secreção deste hormônio é pouco influenciada quando considerado seu ciclo diário, enquanto que com uma hora de exposição a altas intensidades de luz (lâmpada incandescente de 100 W, gerando $1040 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), existe um incremento da secreção de melatonina e alteração do ritmo circadiano desse hormônio (caracterizando influência no ritmo circadiano). Deprés-Brummer et al. (1997) relataram supressão do ritmo circadiano da temperatura corporal de ratos Sprage-Dawley expostos a luz constante por oito semanas, contudo, quando os ratos foram alocados novamente em biotério com total escuridão os padrões circadianos foram restaurados no período de uma semana. Neste mesmo estudo, os ratos mantidos em luminosidade permanente apresentaram uma supressão do ritmo circadiano dos leucócitos e linfócitos em uma amplitude de 50% (indicando imunossupressão) e retornando aos padrões de normalidade circadiana em duas semanas.

Buscando investigar pequenas alterações no ambiente, Tang et al. (1999) analisaram o efeito do entardecer e amanhecer em ratos de laboratório concluindo que uma simulação mais próxima dos acontecimentos da natureza traz diferentes comportamentos nos animais que são submetidos a alterações bruscas de luminosidade e, que o período em que ocorre a simulação do entardecer é mais sensível aos ratos quando comparado com o amanhecer, revelando a característica de atividade noturna do animal. Yamanaka et al. (2008) verificaram que exposições a novos ambientes em períodos sistematicamente controlados onde existe a roda de atividade para ratos, fez com que o comportamento e adaptação circadiana de animais fossem diferentemente facilitados em relação a animais que não tinham

acesso a roda de atividade. Esse grupo de autores destaca que os mecanismos causadores dessa diferente aceleração na adaptação pela modificação do arrastamento são desconhecidos.

Alguns estudos analisaram a influência do ciclo claro-escuro em indivíduos cegos, indicando que a luminosidade parece ter a capacidade de modificar o ritmo circadiano nesses pacientes. Ballastela et al. (1998) relatam estudos que encontraram variações no ritmo circadiano da melatonina, hormônio do crescimento, cortisol, hormônio luteinizante, função das gônadas, prolactina, testosterona e hormônios tireoideanos em cegos, mostrando que as informações de luminosidade podem influenciar o ritmo circadiano mesmo em pacientes com deficiência visual. Silva et al. (2005) descreveram a sincronização do ritmo circadiano em primatas cegos e entenderam que estes animais são capazes de responder a estímulos de luminosidade mesmo não possuindo os fotorreceptores clássicos. Tosini et al. (2007) relataram a existência de pelo menos três tipos distintos de fotorreceptores fóticos que podem possivelmente participar desse processo de captação de luminosidade e sua influência no ritmo circadiano. Wee et al. (2002) analisaram uma espécie mutante de rato com lesão no nervo óptico e puderam verificar que essas células lesadas não necessariamente são utilizadas para que o núcleo supraquiasmático possa determinar a ritmicidade circadiana da atividade física espontânea em roda de atividade. Verifica-se, com isso, que a luminosidade exerce importante papel na ritmicidade circadiana de diversos parâmetros inclusive em indivíduos com deficiência visual.

Esse fenômeno pode ser compreendido por meio de estudos como o de Moore-Ede (1983), que pregou a existência de consideráveis evidências no sentido de um sistema multi oscilatório no controle circadiano em mamíferos, não oferecendo todo o controle à luminosidade. Este autor relatou ainda que o ritmo circadiano de variáveis fisiológicas tende a adotar diferentes periodicidades no mesmo animal sob circunstâncias semelhantes. No entanto, a luminosidade parece ser apenas o mais importante dos sincronizadores, visto que existem outros mecanismos não fóticos capazes de influenciar os ritmos circadianos, já bem relatados na literatura. Antle et al. (2007) em um estudo com quatro interessantes experimentos afirmaram que oscilações fisiológicas diárias e o comportamento são regulados pelo “relógio circadiano endógeno” que pode ser (re) inicializado por

eventos sincronizadores fóticos (luminosidade) ou não fóticos (atividade física, por exemplo), mostrando a complexidade dos mecanismos capazes de influenciar a ritmicidade circadiana. Quando se contempla a interação de mecanismos fóticos e não fóticos caracteriza-se assim os sistemas temporizadores, um complexo de diferentes sincronizadores trabalhando em conjunto. Segundo Lent (2010) esses sistemas são extremamente importantes para a sobrevivência visto que tornam o ser humano altamente adaptável e não dependente de um único fenômeno. A figura 3 fornece uma representação esquemática muito elucidativa deste complexo, proposto por Yanielli & Harrington (2004) e adaptado por Back et al. (2007).

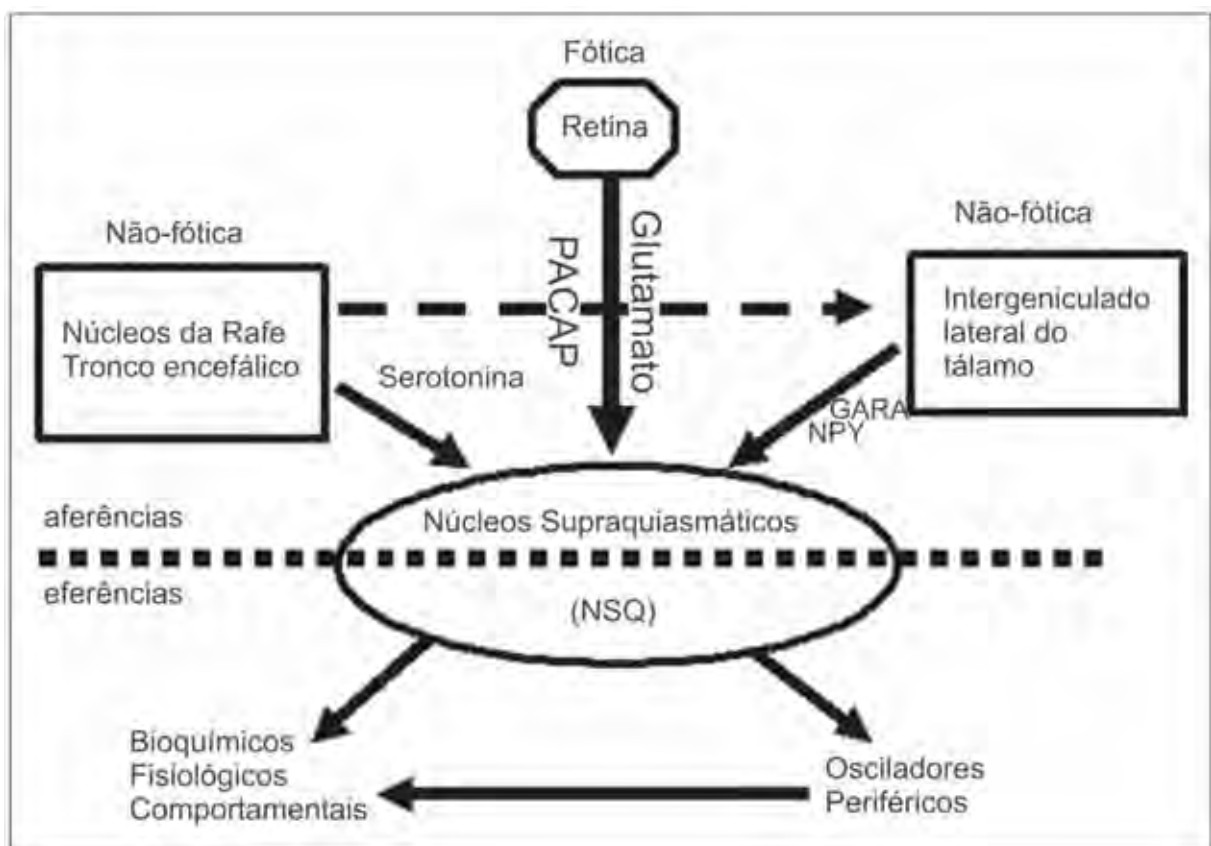


Figura 3. A informação fótica advinda da luminosidade é captada pela retina (via aferente) e excita os neurônios do NSQ por meio de alguns neurotransmissores (PACAP – peptídio ativador da adenilato ciclase hipofisária e glutamato). Os principais mecanismos não fóticos passam pelos núcleos da rafe e pelo intergeniculado lateral do tálamo (vias aferentes). Uma vez excitado o NSQ, os osciladores periféricos, bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais são sincronizados, independentemente da via aferente utilizada. Imagem extraída de Back et al. (2007).

2.2. Cronobiologia e exercício

No final da década de 90 já existiam evidências de que o exercício físico poderia ser um sincronizador (arrastador) não fótico do ritmo circadiano de animais. O exercício em alguns momentos é capaz de causar grandes arrastamentos (atrasos ou avanços na secreção de hormônios em função do dia, por exemplo), enquanto em outras oportunidades essas alterações são atenuadas (BOBRZYNSKA & MROSOVSKY, 1998). O exercício físico aeróbio é uma das modalidades que pode proporcionar grande influência na ritmicidade circadiana, atuando como um sincronizador não farmacológico e não fótico que pode ser prescrito no sentido de agir benéficamente em pessoas com distúrbios do sono (BACK et al., 2005). Reeth et al. (1994) postularam que o exercício se caracteriza como um agente não fótico capaz de atuar como sincronizador biológico da tireotropina e melatonina em humanos. Neste contexto, em 2004, Barger et al. controlaram o período de sono-vigília de 18 jovens do sexo masculino, os separando em dois grupos e incluindo apenas em um grupo o exercício físico. Através de análises do ritmo circadiano da melatonina concluíram que o exercício físico (ciclo-ergômetro) se mostrou capaz de auxiliar na adaptação de alterações no ciclo claro escuro dos indivíduos.

Em outro estudo delineado para humanos, Baher et al. (1999) analisaram as combinações de luminosidade e exercício físico alternando indivíduos entre condições de luz forte e fraca, realizando exercício físico ou não. Neste estudo concluíram que exercício intermitente, com duração de 15 minutos em intensidade correspondente a 50 - 60 % da frequência cardíaca máxima calculada pela idade dos indivíduos, parece não ter sido capaz de agir como agente sincronizador circadiano. Os autores interpretaram que possivelmente a intensidade e duração não tenham sido suficientes para causar qualquer alteração. Corroborando com a informação de que o exercício físico não é capaz de alterar a ritmicidade circadiana, Cain et al (2007) em um estudo com 44 dias de duração em humanos, alteraram os períodos de sono/vigília impondo-os condições de exercício ou repouso e monitorando algumas variáveis fisiológicas. O exercício alternado em diversos períodos do dia consistiu em duração de 45 minutos em uma intensidade correspondente a 65 % da frequência cardíaca máxima, realizado em ciclo ergômetro a 65 - 70 RPM. Por meio desta investigação concluíram que o exercício físico não parece ser um estímulo não fótico capaz de alterar os períodos e o ritmo

circadiano de humanos, no entanto, alertam para o fato de o estudo ter analisado apenas o efeito do exercício, não isolando outros fatores que conhecidamente podem ter grande efeito no relógio biológico. Youngstedt et al. (2002) expuseram 18 ciclistas (16 homens e duas mulheres) altamente condicionados fisicamente a 3 horas em luz clara durante duas madrugadas e os distribuíram aleatoriamente em um grupo que realizou exercício físico em intensidade correspondente a 65-75% da frequência cardíaca máxima durante esse período, e outro grupo que apenas permaneceu sob tal iluminação. Neste estudo não foi encontrada quaisquer diferença entre os grupos quanto ao arrastamento no ritmo circadiano da temperatura retal e da excreção urinária de 6-sulfatoximetatonina (6-SMT).

Apesar de alguns pesquisadores não terem encontrado dados convincentes de que o exercício poderia causar alguma influência no ritmo circadiano humano, os dados de Buxton et al. (1997) discordam dessas afirmações. Em seu estudo, os participantes foram submetidos a dois tipos de exercício físico noturno. Primeiramente, controlando os períodos de sono-vigília, utilizaram exercício intermitente em ergômetro de braço em uma intensidade de 40 % do consumo máximo de oxigênio por 15 minutos com intervalos de 6 minutos, intercalado com ciclo ergômetro em intensidade de 60 % do consumo máximo de oxigênio com mesma duração, totalizando 3 horas de exercício; e posteriormente, prescreveu exercício contínuo em um simulador de escadas a 75 % do consumo máximo de oxigênio durante 40 minutos. Nesta investigação os autores concluem que exercício físico agudo com uma hora de duração e alta intensidade pode ser tão útil como agente sincronizador circadiano não fótico em humanos quanto o exercício de intensidade mais baixa com maior duração, sendo que os dois tipos de exercício físico facilitaram a adaptação a novos ciclos claro-escuro e podem ser utilizados para a regulação do relógio biológico humano.

Não satisfeitos com os resultados acima, Buxton et al. (2003) voltaram a investigar o exercício físico idêntico a de seu estudo anterior em humanos, no entanto alternando os horários de atividade. Verificaram com isto que o exercício de mesma intensidade da utilizada em seu estudo de 1997, no entanto realizado em diferentes períodos do dia causam diferentes variações na concentração plasmática de melatonina. Neste estudo, os autores afirmaram que exercício realizado no início da noite (~ 18:30h) causa diferentes alterações em relação a exercício realizado pela

manhã, tarde ou madrugada, ou ainda em indivíduos que não realizaram qualquer tipo de exercício físico. Com isso concluem que o exercício prescrito em horário adequado pode avançar ou atrasar o ritmo circadiano em jovens saudáveis do sexo masculino sem a utilização de qualquer meio farmacológico.

No que diz respeito ao modelo animal, Koteja et al. (2003) discutiram em seu estudo alguns dos motivos os quais poderiam levar a diferentes tendências nos resultados no ritmo circadiano da atividade locomotora. Um desses tópicos relata os diferentes níveis de atividade. Os autores discutem que a relação entre o nível de atividade motora e o comprimento do ritmo circadiano são bastante complexos. Concluem que pouca atenção tem sido dada para a intensidade e duração do exercício realizado na roda de atividade da gaiola de ratos para que isto seja utilizado como parâmetro para determinar variações no ritmo circadiano e, portanto, deve-se dar especial atenção quanto à interpretação dos dados coletados durante esses experimentos já que o ritmo circadiano é, definitivamente, influenciado por mais de um mecanismo regulatório e que esses mecanismos podem interagir com o nível de atividade motora de diferentes maneiras.

Uma das variáveis constantemente mensuradas que apresenta ritmicidade circadiana é o hormônio melatonina (n-acetil-5-metoxitriptamina), secretado pela glândula pineal, que sofre grande influência da luminosidade e do exercício físico em sua expressão. A melatonina tem sido relacionada com a prevenção do câncer de peito em mulheres e em um estudo relacionando o exercício físico e a luminosidade como agentes capazes de influenciar a melatonina e conseqüentemente prevenir o câncer, Knight et al. (2005) concluiu que o exercício físico pode ser relacionado (assim como a luminosidade) como um agente capaz de aumentar a produção desse hormônio e por conseqüência auxiliar na prevenção da doença na população estudada. A melatonina possui ainda associações distintas das até então apresentadas. Por seu caráter lipofílico e hidrofílico (anfifílico), é capaz de transpor facilmente barreiras fisiológicas tanto em meio aquoso quanto lipídico, carrega consigo relevante papel como agente antioxidante de forma direta e indireta (REITER et al., 2004; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2011), sendo dez vezes mais potente que o alfa-tocoferol e a vitamina C na prevenção de peroxidação lipídica, e apresenta um papel de proteção do dano muscular em ratos exercitados (TAN et al., 1993; HARA et al., 1996). Sabe-se também que a administração

exógena de melatonina gera aumento da produção do hormônio do crescimento (KJAER, 1995). Concomitantemente às propriedades já apresentadas, a n-acetil-5-metoxitriptamina está associada a modulações no metabolismo energético durante o exercício, preservando os estoques de glicogênio por meio de modificações no metabolismo dos carboidratos e lipídios de animais exercitados (MAZEPA et al., 2000).

Entendendo que a luz é o mais importante sinal do ambiente capaz de induzir alterações cronobiológicas e no ritmo circadiano, estimulando alterações comportamentais e fisiológicas diversas (CLOUGH, 1987), parece inteligível sua capacidade de causar transitoriedade na homeostase, podendo gerar estresse assim como o exercício físico. Uma vez gerado um desvio na homeostase orgânica, propõe-se ocorrer uma reorganização dos sistemas em diversos níveis, entre eles o sistema imune (ROSA & VAISBERG, 2002). As alterações temporárias da resposta imune que são causadas por uma sessão de exercício físico são denominadas como respostas agudas ao exercício. Alguns estudos que analisam esta resposta quando causada pelo exercício físico utilizando a contagem do número total de linfócitos (NIEMAN et al., 1994), neutrófilos (DUFAUX & ORDER, 1989), monócitos (MACHINNON, 1997) e citocinas (SHEPARD & SHEK, 1994; NORTHOFF et al., 1994), e verificaram grande Influência da intensidade do exercício e do desenho experimental aplicado sobre os resultados.

Em estudos que envolvem exercícios voltados a *performance* e cronobiologia, o tempo limite realizado sob intensidade de limiar anaeróbio até a exaustão (BARON et al. 2008; FONTANA et al. 2009), ou resultado de competições esportivas (ATKINSON et al., 1994) têm sido utilizado como parâmetros para a análise de variações cronobiológicas. Quando buscaram analisar qual seria o melhor horário do dia para a realização de um programa de treinamento, Atkinson & Reilly (1996) concluíram que o mesmo pode ser determinado simplesmente perguntando para o atleta sobre em que momento do dia ele se sente melhor ou analisando as melhores *performances* em função do horário de sua realização. Seguindo a tendência de diversas variáveis bioquímicas, a *performance* também parece ser influenciada pelo ritmo circadiano em humanos (ATKINSON & REILLY, 1996; DRUST et al., 2005; REILLY & WATERHOUSE, 2009). Em *performances* de longa distância, alguns pesquisadores encontraram melhores resultados no período da tarde quando

comparado com a manhã (ATKINSON et al., 1994) e a temperatura corporal parece possuir um importante papel nessas variações (REILLY & BROOKS, 1982). Apesar dessas considerações e das vantagens do modelo animal, não existem estudos nesta área utilizando este modelo.

3. JUSTIFICATIVA

A maioria dos experimentos citados na revisão bibliográfica deste documento, que envolvam exercício com intensidade controlada em diferentes horários é aplicada em humanos. No modelo animal pouco se conhece sobre esses fenômenos e mesmo em desenhos metodológicos menos complexos, alguns investigadores não se atentam para o horário de aplicação dos testes e executam seus experimentos durante o período de sono do rato (que geralmente se caracteriza em um horário mais cômodo para o pesquisador por ser durante o dia) sem medir as possíveis interferências ou sequer considerá-las. Acreditamos que isso possa gerar uma privação ou ao menos interrupção do sono dos animais, que de maneira crônica pode concorrer com a possibilidade de gerar condições experimentais inadequadas, usurpando a robustez tão requerida na metodologia científica. Outro fato é que não se conhece as conseqüências da manipulação do horário da aplicação dos testes sobre a determinação da intensidade correspondente ao limiar anaeróbio, sobre a *performance* no exercício realizado até a exaustão nessa intensidade em ratos, ou possíveis modulações metabólicas, hematológicas e bioquímicas geradas no organismo do animal por ação do exercício e horário, ou da interação desses efeitos. O conhecimento mais profundo dessa interação no modelo animal é extremamente importante por conta da grande dificuldade em se realizar alguns experimentos com robustez no modelo humano. Atkinson & Reilly (1996) relatam a importância do controle de variáveis ambientais, motivacionais e nutricionais na acurácia de respostas cronobiológicas de experimentos que envolvem o exercício. Com o modelo animal, podemos controlar muito bem todas essas variáveis e realizar procedimentos impossíveis no modelo humano, realizando a extração de tecidos de diversos órgãos para o aprofundamento do conhecimento nesse campo.

Assim sendo, o procedimento utilizado para a identificação individual da intensidade de esforço na qual os animais serão submetidos por ocasião desta dissertação será o teste de lactato mínimo, portanto, torna-se importante investigar um princípio metodológico do protocolo em um primeiro momento. Originalmente Tegtbur et al. (1993) utilizaram a função spline para a determinação da intensidade e lactacidemia correspondentes ao protocolo, enquanto que ao longo dos anos diversos pesquisadores utilizaram a função polinomial de segunda ordem (Ribeiro et al., 2009) ou um método de simples visualização (Pardono et al., 2005).

Investigaremos se a determinação da intensidade e lactacidemia correspondentes ao teste de lactato mínimo podem ser influenciadas pelo procedimento matemático ou não matemático adotado. Feito essa análise, poderemos utilizar o método ideal para a determinação das variáveis deste protocolo para a aplicação correta da intensidade do exercício.

Uma vez que buscaremos investigar os efeitos do horário, serão aplicados testes no tanque de natação no período noturno em ratos. Sabendo a grande influência da luz sobre o ritmo circadiano do rato, será realizado um experimento para a identificação de uma intensidade e espectro luminoso ideal, que possibilite a visualização do animal e ao mesmo tempo influencie ao mínimo a ritmicidade circadiana. Após a identificação da luminosidade, aplicaremos o teste de lactato mínimo e a *performance* sob esta intensidade para investigarmos algumas variáveis bioquímicas em soro e tecido muscular esquelético e hepático a fim de aprofundarmos os conhecimentos sobre as consequências metabólicas e bioquímicas de tal exercício. Vale ressaltar que não existem dados na literatura que exponham dados sobre o tempo limite de nado de ratos sob intensidade relativa de limiar anaeróbio determinada individualmente.

Em outro experimento, a fim de discutirmos o impacto do horário sobre essas variáveis, os ratos serão submetidos a manipulação em biotério, aplicação do teste de lactato mínimo e a um exercício até a exaustão em dois horários distintos (12:00 h e 20:00 h). O perfil hematológico, muito usado nas ciências do esporte como antidoping (LIPPI et al., 2010) ou para a identificação das condições de saúde de atletas antes, durante e após competições (BANFI et al., 2004), será analisado nos ratos, para que conheçamos as consequências agudas de um exercício aeróbio até a exaustão nesses parâmetros.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Identificar se o exercício físico agudo ou a manipulação crônica de ratos em dois horários distintos do dia são capazes de influenciar a determinação da intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo, o tempo limite sob esta intensidade e/ou o perfil hematológico e bioquímico de ratos submetidos a exercício de natação.

4.2. Objetivos específicos

1. Analisar três diferentes procedimentos, matemáticos ou não matemático, utilizados na determinação da intensidade e lactacidemia correspondentes ao teste de lactato mínimo – experimento 1;

2. Identificar o tempo de exaustão sob a intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo, conduzindo a análise da concentração de glicogênio em diversos músculos do membro inferior a fim de investigar uma possível associação da depleção deste metabólito com a exaustão – experimento 2;

3. Investigar o efeito crônico do horário do dia da manipulação e o efeito agudo do exercício físico sobre as variáveis do teste de lactato mínimo e sobre o tempo de exaustão nesta intensidade – experimento 3;

4. Identificar as consequências de um exercício até a exaustão na intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo sobre o perfil hematológico de ratos manipulados cronicamente e exercitados agudamente em dois horários distintos do dia – experimento 4.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostra

Foram utilizados 80 ratos albinos da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu e mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno (quatro ratos por gaiola), mantidos em ambiente climatizado de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa do ar entre 45 e 55 % e alimentados com ração balanceada Labina-Purina[®] para roedores e água *ad libitum*. Foi utilizado um decibelímetro para controle de ruídos no biotério, que não ultrapassaram os 85 decibéis, conforme recomendação (ANDERSEN et al., 2004), e a iluminação foi minuciosamente controlada. O experimento foi realizado de acordo com a legislação Brasileira corrente e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA foram rigorosamente seguidas. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animal (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista sob a decisão constante do processo número 018/2010 e protocolo número 3881 de 20 de agosto de 2010.

5.2. Procedimentos gerais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, compondo dois grupos controle (12:00 h e 20:00 h) e dois experimentais (12:00 h e 20:00 h). Além disso, foram mantidos em luminosidade padrão, com ciclo claro/escuro de 12/12h, sendo luz branca no período diurno e escuridão total no período noturno, cujo início ocorreu sistematicamente às 18:00 h.

Todos os animais chegaram ao biotério com 45 dias de idade, sendo imediatamente alojados nas condições descritas para adaptação ao ambiente. Aos 90 dias de idade, os animais realizaram o teste de lactato mínimo (em horário específico) e após 48 h de intervalo, foram submetidos a uma série de exercício até a exaustão sob a intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo (também realizada em horário específico). Imediatamente após tal esforço (ou em repouso no mesmo horário para os grupos controle), os animais foram eutanasiados. O desenho metodológico destes procedimentos está apresentado na figura 4. Cada grupo

contou com 20 animais ($n = 20$), os quais foram submetidos aos procedimentos de manipulação (troca de gaiolas para limpeza, pesagem dos animais, adição de ração, lavagem dos bebedouros e adição de água, etc) e testes (teste de lactato mínimo e exercício de tempo limite sob intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo) respeitando o horário especificado para seu grupo (12 ou 20:00 h) e sob luminosidade ambiente do momento.

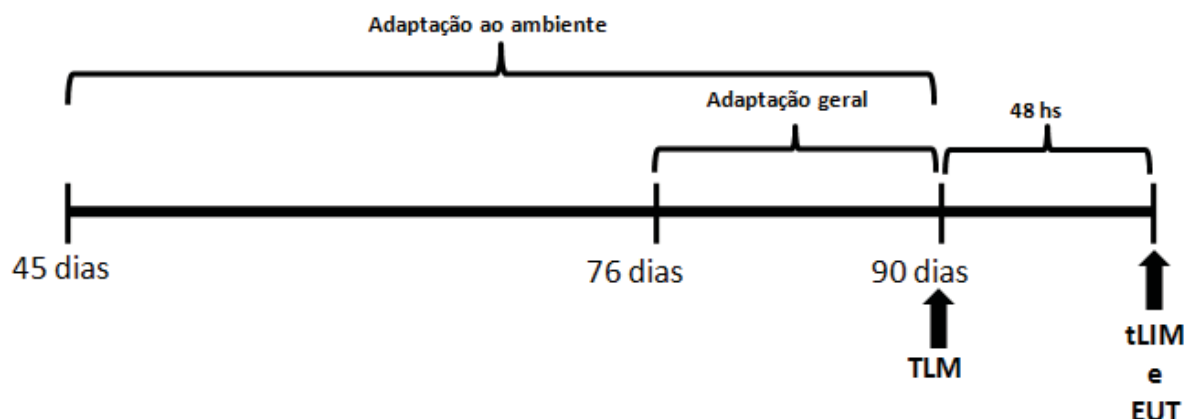


Figura 4. Ilustração do desenho metodológico. Aos 45 dias de idade os animais foram alojados nas condições ambientais já descritas, passando por duas semanas de adaptação ao exercício e meio líquido após os 76 dias (descrita a seguir). Aos 90 dias os animais realizaram o teste de lactato mínimo (TLM) e após 48 hs de intervalo foram submetidos ao exercício até a exaustão sob intensidade de lactato mínimo (tLIM) e eutanasiados (EUT) em seguida.

Para os animais manipulados ou testados às 20:00 h foi utilizada iluminação especial (descrita adiante). Todos os ratos foram submetidos a procedimentos de adaptação ao meio líquido e ao material utilizado para imposição de cargas e posteriormente a um teste para determinação da intensidade correspondente ao limiar anaeróbico (teste de lactato mínimo). Feito estes procedimentos, apenas os grupos que contém exercício realizarão o teste de *performance* nos horários pré estipulados para cada grupo.

5.3. Iluminação

Com a finalidade de evitar a retinopatia fototóxica nos animais albinos foi utilizada em todos os ambientes uma lâmpada incandescente, Marca Philips, modelo Soft, de 100 W, instalada em um dimer (potenciômetro) para que a intensidade da luz fosse controlada. Esse padrão de lâmpada possui uma temperatura de cor de aproximadamente 2700 K e luz de característica amarelada em comprimentos de

onda entre 565 e 590 nm. A intensidade da luz foi controlada de maneira com que não ultrapassasse 60 lux dentro da gaiola (conforme recomendação de ANDERSEN et al., 2004). O luxímetro foi utilizado para a identificação da intensidade de todas as luzes do biotério e da sala de testes.

A intensidade da luz vermelha foi determinada pela mínima intensidade que permitiu a perfeita realização de todas as manipulações e aplicação de testes realizados no período noturno (realizada no experimento 2). Foi utilizado um filtro vermelho nos refletores do biotério e da sala de avaliação, o qual permitiu a emissão de luz de espectro vermelho, com ondas luminosas significativas acima de 600 nm, conforme figura 5.

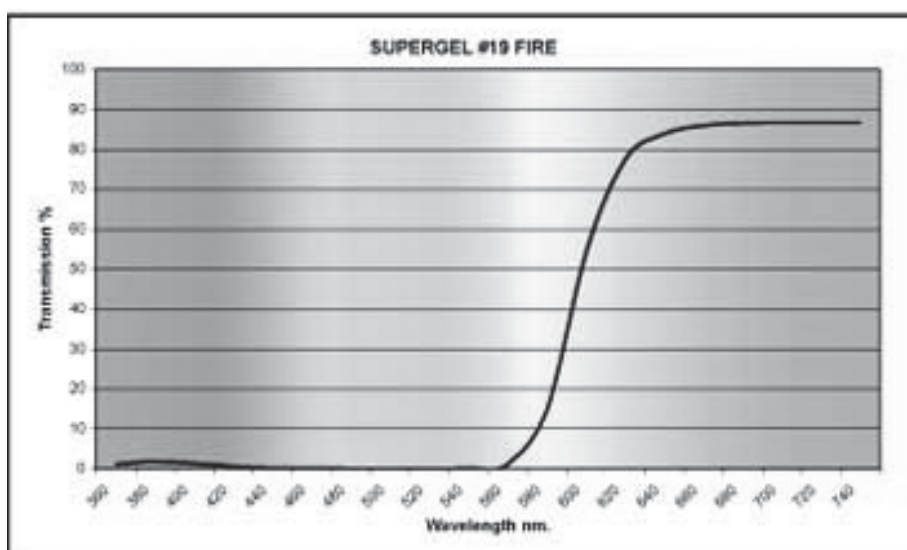


Figura 5. Quadro de distribuição de energia espectral do filtro de luz vermelha marca Rosco, modelo Supergel #19 fire.

5.4. Procedimentos de adaptação ao meio líquido e testes aquáticos

Os animais foram mantidos durante todo o experimento sob regime de iluminação condizente ao seu grupo, sendo o biotério e a sala de avaliação dos animais localizados em ambiente isolado de luminosidade externa.

Foram realizadas 10 sessões de adaptação ao meio líquido antes do início dos testes de nado, sendo: 2 sessões de adaptação ao meio líquido em água com 15cm de profundidade e em dias seguidos; 3 sessões de adaptação à natação com 50cm de profundidade; e 3 sessões de nado em tanque profundo (120 cm) intercaladas com 2 sessões utilizando cargas de 2 % do peso corporal. Estes

procedimentos visaram apenas à adaptação ao meio líquido, à manipulação e ao elástico ao qual foram inseridas as cargas, não visando qualquer característica de treinamento. Todos os procedimentos tiveram duração de 10 a 20 minutos e foram realizados de maneira individual, em água com temperatura mantida em $31 \pm 1^\circ \text{C}$ e com os tanques de nado divididos por tubos cilíndricos de PVC com 30 cm de diâmetro. Apenas para o experimento 1 foi utilizado um procedimento de adaptação semelhante, contudo, com duração de 30 minutos diários. Verificando que as propriedades adaptativas eram mantidas com menores períodos de nado, o protocolo com menor tempo e pequenas cargas foi utilizado a partir do experimento 2.

5.4.1. Teste de lactato mínimo

O teste de lactato mínimo foi originalmente proposto para humanos (TEGTBUR et al., 1993), sendo posteriormente adaptado para ratos (VOLTARELLI et al., 2002), consistindo por duas breves séries de exercício de curta duração e alta intensidade para a indução ao estado hiperlactacidêmico (DE ARAUJO et al., 2007), uma fase de recuperação que permite o movimento do lactato produzido no músculo no sentido da corrente sanguínea e finalmente por uma fase incremental, na qual o comportamento do lactato sanguíneo gera uma representação gráfica em forma de “U” (TEGTBUR et al., 1993). O ponto no qual é determinado o lactato mínimo pode ser utilizado para a determinação da intensidade correspondente a de máxima fase estável de lactato, correspondendo com a máxima intensidade de esforço na qual ocorre o balanço entre a produção e a remoção de lactato (VOLTARELLI et al., 2002; DE ARAUJO et al., 2007).

O teste de lactato mínimo foi realizado conforme De Araujo et al. (2007), sendo a fase de indução a hiperlactacidemia correspondente a exercício com carga de 13 % do peso corporal (%PC) e duração de 30 segundos, seguido de um intervalo de 30 segundos e mais uma série de exercício com 13 %PC realizada até exaustão. Após respeitar 9 minutos de intervalo, onde ocorreram coletas de amostras sanguíneas nos minutos 7 e 9 para identificação do lactato pico, foi realizada a fase incremental. O lactato pico foi considerado como sendo a maior concentração de lactato sanguíneo encontrado no período de recuperação, independente de ter ocorrido no minuto 7 ou 9. Os animais permaneceram em água

rasa durante os intervalos, para evitar o estresse térmico. A fase incremental envolveu exercício de natação iniciando com 4 %PC e incrementos de 0,5 %PC a cada estágio de 5 minutos. Os estágios foram separados por 30 segundos para coleta sanguínea visando a determinação da concentração de lactato. Os dados de intensidade e lactacidemia resultantes foram plotados graficamente e submetidos a três procedimentos de determinação do gradiente zero (experimento 1), que interpolado ao eixo X e Y correspondeu à intensidade e lactacidemia, respectivamente (figura 6). Baseado nos resultados do experimento 1, foi utilizado o ajuste polinomial de segunda ordem para os experimentos 2, 3 e 4.

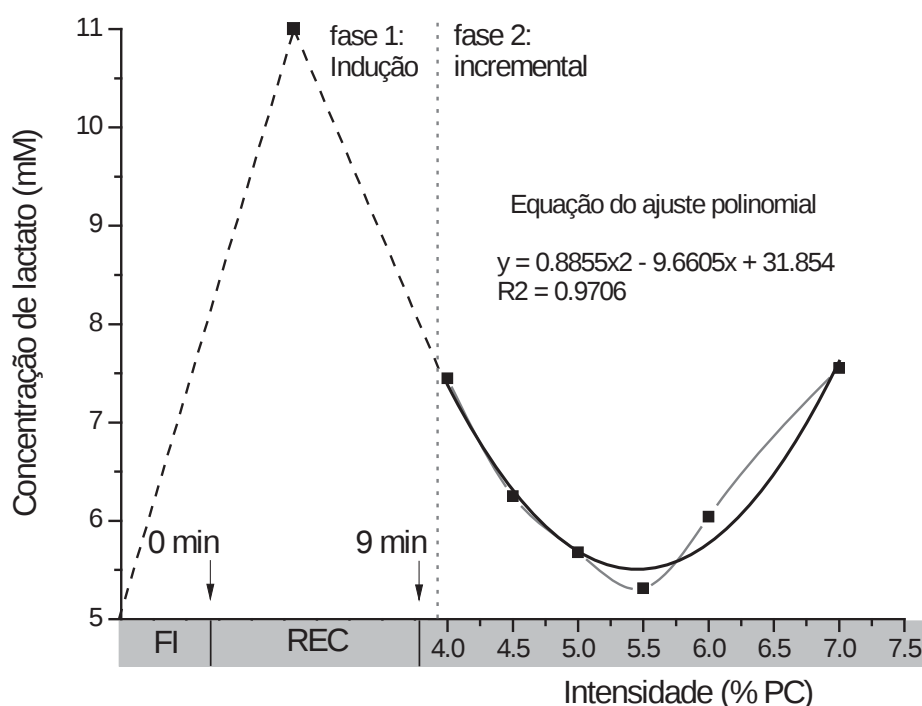


Figura 6. Ilustração didática das fases para a determinação da intensidade (eixo X) e lactacidemia (eixo Y) do teste de lactato mínimo, para o rato 2 do experimento 1. Após a fase de indução (FI) e do intervalo de recuperação (REC), a fase incremental foi aplicada. A linha mais espessa mostra o comportamento do lactato em função polinomial de segunda ordem (com a respectiva equação), enquanto a linha fina mostra a função spline.

5.4.2. Teste de *performance*

O teste para a determinação das *performances* dos animais foi realizado na intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo, por meio do registro do tempo de natação do animal desde sua colocação no tanque até o momento em que ceçassem os movimentos coordenados e o animal não mais era capaz de retornar à superfície por um período de pelo menos 15 segundos (MCARDLE & MONTOYE, 1966). O critério de exaustão foi aceito após concordância de dois observadores experientes (sem modificação dos observadores ao longo do experimento), considerando o descrito acima, confirmando a atenuação dos movimentos de reflexo do animal conforme sugerido por Coop et al. (2010).

5.4.3. Obtenção do material biológico

Conforme dispõe a necessidade do grupo (horário, padrão de luminosidade e condição de exercício) os animais foram eutanasiados em uma câmara de gás carbônico (CO₂) devidamente construída para tal. Posteriormente foram submetidos à toracotomia para obtenção de sangue por punção cardíaca e extração do tecido hepático (experimento 2). Para os animais que realizaram o teste de *performance*, a eutanásia foi conduzida imediatamente após tal procedimento.

A amostra sanguínea foi dividida em 2 partes: a) dispensada imediatamente em um tubo de polietileno contendo agente anticoagulante K₃EDTA (fl Medical, Torreglia, PD, Itália) para a realização do hemograma; b) centrifugada e armazenada em alíquotas de soro para as análises bioquímicas.

Foram também coletadas amostras do tecido hepático (experimento 2) e muscular esquelético (experimento 3) para a identificação do glicogênio tecidual específico.

5.4.4. Procedimentos analíticos

Concentração de Lactato

Com a utilização de microtubos heparinizados de vidro previamente calibrados, foram coletados 25 µL de sangue da porção distal da cauda dos ratos, que foram imediatamente transferidos para tubos de microcentrífuga que continham 400 µL de ácido tricloroacético (TCA – 4 %) para a desproteínização da amostra.

Após a preparação da amostra e reativos (ENGEL & JONES, 1978), a concentração do lactato foi medida a 340 nm contra a curva de calibração.

Perfil hematológico

Coletado o material biológico conforme descrito, as amostras (que não apresentaram qualquer evidência visual de hemólise) foram imediatamente transportadas a um laboratório comercial para a condução das leituras (em duplo cego, visto que os bioquímicos responsáveis pelas análises não conheciam o experimento e não sabiam quais animais eram controle e experimental, além de não possuírem qualquer conflito de interesses nos resultados). Os parâmetros hematológicos (contagem de células vermelhas [eritrócitos], hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, distribuição dos eritrócitos em função de seu tamanho [RDW – red cell distribution width], contagem das células brancas [leucócitos], linfócitos, monócitos e neutrófilos) foram analisados seguindo os seguintes princípios de medição: a) foco hidrodinâmico para as células vermelhas; b) citometria de fluxo com laser semiconductor para as células brancas; e c) método colorimétrico para hemoglobina. Todos os hemogramas foram realizados por metodologia de automação, por meio do Contador Automático MAXM Coulter, e da observação da lâmina de todos os animais que tinham solicitação de hemocultura, para a verificação da presença de granulações tóxicas em neutrófilos. Como foi utilizado um equipamento automatizado calibrado para humanos, foram realizados alguns testes piloto para certificar a calibração para sangue de ratos Wistar.

Glicogênio muscular e hepático

Após a extração de 200 - 250 mg do tecido muscular esquelético, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio de vidro contendo 0,5 mL de KOH 1N por um período de 20 minutos. Com a adição de uma solução de Na_2SO_4 o glicogênio foi precipitado em etanol fervente e em seguida centrifugado. A determinação da concentração por fenol em meio ácido foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm segundo a técnica padronizada por Dubois et al. (1956). O tecido hepático seguiu as mesmas condições, no entanto, com amostra de aproximadamente 500 mg de tecido e ajuste proporcional das soluções utilizadas.

Demais análises bioquímicas

Para a determinação da creatinina foi utilizado os reagentes do kit comercial da marca Bioclin, adicionados a 100 μ L de soro e analisado em 510 nm aos 30 e 90 segundos, sendo realizados os cálculos previstos na bula do kit.

A concentração de proteínas totais obtidas do soro foi determinada por meio do método proposto por Lowry et al. (1951), baseado no reagente Folin-Ciocalteu, o qual sofre uma redução quando reage com proteínas. As amostras foram lidas por espectrometria a 650 nm.

Para a determinação da concentração de ácido úrico em soro, foi seguida a metodologia descrita no kit comercial marca Laborlab.

O método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase (HENRY; CANNON; WILKEMAN, 1974) foi utilizado para a determinação das concentrações de glicose sanguínea, com kit comercial da marca Laborlab®.

Amostras do soro foram submetidas ao procedimento proposto por Regow et al. (1971) e adaptado por Nogueira et al. (1990) para a determinação dos ácidos graxos livres, lendo a absorbância a 435 nm.

A albumina sérica foi determinada pelo método colorimétrico, com a utilização do kit comercial Wiener Lab, lida a 625 nm.

5.4.5. Tratamento estatístico

Os procedimentos estatísticos utilizados encontram-se descritos em cada um dos artigos científicos produzidos nesta dissertação, dispostos nos apêndices.

6. RESULTADOS

Os resultados foram divididos em quatro artigos científicos, os quais estão apresentados em forma apêndices, cada um respondendo um objetivo específico da presente dissertação.

Investigações metodológicas sobre o teste de lactato mínimo foi o objetivo específico 1, disposto no apêndice 1 com o manuscrito intitulado “METHODS OF EXERCISE INTENSITY AND LACTATEMIA DETERMINATION IN LACTATE MINIMUM TEST IN RATS”, a ser submetido para a revista científica “COMPARATIVE EXERCISE PHYSIOLOGY.”

No apêndice 2 foi investigada a aplicação do exercício de natação em condições de luminosidade de baixa intensidade, com análise da depleção do glicogênio muscular esquelético do membro inferior de ratos, com o artigo intitulado “TIME TO EXHAUSTION AT MAXIMAL AEROBIC CAPACITY IN RATS: GLYCOGEN-BASED STUDY OF FATIGUE” a ser submetido para a revista “APPLIED PHYSIOLOGY, NUTRITION AND METABOLISM”.

O apêndice 3 trata do efeito do horário sobre a determinação das variáveis do teste de lactato mínimo e da *performance* em exercício até a exaustão, em artigo intitulado “TIME TO EXHAUSTION AT LACTATE MINIMUM INTENSITY IS GREATER IN THE DARK PERIOD IN SWIMMING RATS”, a ser submetido para a revista “CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL”.

Com o intuito de investigar o perfil hematológico, foi produzido o artigo intitulado “HANDLING AND EXERCISE AT LACTATE MINIMUM INTENSITY PERFORMED UNTIL EXHAUSTION ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS: TIME OF DAY EFFECT”.

7. DISCUSSÃO

Discussão específica e mais aprofundada dos dados obtidos por ocasião dos experimentos encontra-se em cada um dos apêndices, no entanto, realizaremos uma discussão sucinta neste momento.

Por ocasião do primeiro experimento, pudemos constatar a igualdade nos resultados dos diferentes procedimentos utilizados para a determinação da intensidade e lactacidemia correspondentes ao teste de lactato mínimo. De fato, cada método possui uma característica, sendo que a partir da equação da função polinomial de segunda ordem uma suavização do conjunto de dados é observada, considerando todos os pontos plotados. Enquanto isso, tanto a função spline quanto a visualização simples se aproximam muito do menor ponto plotado, visto as características de cada método, confiando toda a análise a um único ponto. Não foram encontradas diferenças significativas entre os procedimentos, fato que associamos ao baixo número de pontos que o protocolo de lactato mínimo proporciona (um ponto a cada cinco minutos), porém, na presente dissertação, decidimos pela utilização do ajuste polinomial de segunda ordem, pela possibilidade de determinação de um percentual de sucesso da determinação da intensidade e lactacidemia correspondentes (por meio do coeficiente de determinação da equação) e pela cinética matemática do ajuste polinomial de segunda ordem, que nos parece mais semelhante com o comportamento lactacidêmico esperado durante a fase incremental, conforme proposto originalmente por Tegtbur et al. (1993).

A partir da realização do segundo experimento, pudemos adquirir grandes conhecimentos no sentido de definir a iluminação ideal para a aplicação de testes noturnos no modelo de natação com ratos. Torna-se relevante neste momento a informação de que foram utilizadas diferentes tipos de lâmpadas e filtros, até chegarmos no aparato ideal descrito. Inicialmente foi testada uma lâmpada de luz infravermelha, como as utilizadas em consultórios de fisioterapia. Este tipo de lâmpada possui um corte na emissão de ondas espectrais abaixo de 600 nm, exatamente como necessitávamos. Entretanto, o elevado calor gerado, o alto valor financeiro e a baixa durabilidade (cerca de 30 horas) deste equipamento nos conduziram à procura de outro material. A descoberta de quadros de distribuição de

energia espectral (figura 5) produzido por empresas que fabricam filtros para fins artísticos foi a solução para este problema.

Além disso, os resultados de depleção de glicogênio encontrados neste experimento nos surpreenderam. De nosso conhecimento, esta foi a primeira vez que um exercício conduzido até a exaustão foi realizado com determinação individual da intensidade de limiar anaeróbio (capacidade aeróbia máxima) para o exercício de natação em ratos. A depleção de glicogênio foi dramática no membro inferior do animal, representando aproximadamente 78 % de depleção quando considerados todos os músculos analisados (sem distinção de tipagem de fibra muscular). O músculo esquelético Gluteo Máximo, por exemplo, apresentou cerca de 95 % de depleção. Além disso, apesar de a comparação animais VS humanos não ser objeto do estudo, o tempo de exaustão dos animais parece ser maior que os encontrados em humanos para esta intensidade (BARON et al., 2008; FONTANA et al., 2009). Portanto, com substancial controle de intensidade, este experimento mostrou que, para o exercício proposto, a depleção de glicogênio é muito expressiva e este modelo de natação para ratos pode ser mais explorado para o entendimento dos mecanismos envolvidos com a exaustão.

O terceiro experimento nos mostrou um conjunto de dados extremamente interessantes. De nosso conhecimento, esta investigação também se trata de um achado inédito, sendo o primeiro estudo que analisou a influência da manipulação crônica e do exercício agudo realizados em dois horários distintos sobre a determinação do teste de lactato mínimo e exercício até a exaustão nessa intensidade. Não foram encontradas diferenças significativas entre os animais manipulados e testados às 12:00 h em relação à 20:00 h para a intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo, no entanto, o percentual de sucesso da determinação da variável foi 20 % maior no período noturno, assim como a *performance* para os animais que realizaram o exercício neste horário. Esses achados suportam a existência de diferença significativa em função do horário de aplicação de testes e que o período noturno é o melhor momento para a realização de testes de *performance* na natação em ratos.

Finalmente, analisamos as conseqüências do exercício até a exaustão sob intensidade de lactato mínimo e do horário de manipulação crônica em biotério sobre

o perfil hematológico dos animais. Novamente, dados surpreendentes foram encontrados em relação à porção branca do hemograma. Quando se analisa os animais manipulados às 12:00 h se percebe que apresentam valores muito altos na contagem de leucócitos em relação a 20:00 h, sendo significativamente e sistematicamente maiores para todos os componentes leucocitários estudados. Ou seja, houve significativo impacto do horário da manipulação sobre o sistema imunológico dos animais. Também foi encontrado efeito do exercício nessas contagens, conforme já bem relatado na literatura. Já a porção vermelha apenas foi influenciada pelo exercício físico (e não pelo efeito crônico da manipulação em horários distintos), e suas alterações foram associadas a diferença de volume plasmático gerado com a provável desidratação dos animais durante o exercício de longa duração sem reposição hídrica.

De maneira geral, quando se analisa todo o conjunto dos dados obtidos, se percebe grande influência cronobiológica sobre a maioria dos resultados. A alta contagem leucocitária encontrada no experimento 4 nos animais apenas manipulados às 12:00 h em relação às 20:00 h nos alerta profundamente, visto que diversos estudos que investigam vários tipos de patogenias em modelo animal podem não estar se atentando a tal fator. De fato, o sistema imunológico já afetado pela patogenia pode estar sofrendo efeito também do horário e não apenas da patogenia em si, conduzindo pesquisadores a conclusões equivocadas, geradas por um somatório de efeitos não controlados pelo desenho experimental. Quanto ao exercício físico, os animais apresentaram melhores condições de avaliação no período noturno, certificadas pelo perfil hematológico e embasada fortemente com dados da literatura sobre o ritmo circadiano de diversas variáveis, conforme citado na introdução e revisão de literatura deste documento. Além disso, este período gerou maiores índices de sucesso na determinação das variáveis do teste de lactato mínimo e *performance*. Outro importante fator que sofreu influência positiva dos testes noturnos foi o maior índice de animais que apresentaram comportamento de nado contínuo em relação aos testes diurnos.

8. CONCLUSÃO

Experimento 1 - O teste de lactato mínimo para o exercício de natação em ratos pode ser determinado por meio dos três procedimentos propostos (matemáticos ou não matemático), contudo, recomendamos a utilização do ajuste polinomial de segunda ordem;

Experimento 2 - O modelo de natação até a exaustão sob intensidade correspondente ao teste de lactato mínimo aplicado em período noturno é possível de ser realizado e se caracteriza como uma ferramenta útil nas investigações dos mecanismos envolvidos com a exaustão no exercício aeróbio de longa duração;

Experimento 3 - O período noturno é o melhor momento para a avaliação da capacidade aeróbia por meio do teste de lactato mínimo e para o atingimento de melhores *performances* no exercício de natação em ratos;

Experimento 4 – O efeito crônico do horário da manipulação de ratos em biotério é capaz de influenciar drasticamente o perfil hematológico, conduzindo os animais a condições semelhantes às encontradas em algumas potogenias. O efeito do exercício físico na intensidade e volume investigados sobre o perfil hematológico parece ser semelhante em ratos quando comparados ao ser humano.

De maneira geral, este estudo pode servir de base para diversos pesquisadores que utilizam o modelo animal como ferramenta para investigação de doenças ou dos mecanismos da exaustão relacionada ao exercício físico. Os achados em relação aos aspectos cronobiológicos nestes experimentos são expressivos e nos leva a refletir sobre a atenção que deve ser dada para estas condições em futuros estudos no modelo animal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. Gráfica Ave-Maria, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, 2004.
- ANTLE, M.C.; STERNICZUK, R.; SMITH, V.M.; HAGEL, K. Non-photoc modulation of phase shifts to long light pulses. *J. Biol. Rhythms*. 22; 524, 2007.
- ATKINSON, G.; COLDWELLS, A.; REILLY, T.; WATERHOUSE, J. The influence of age on diurnal variations in competitive cycling performances. *J. Sports Sci.* 12: 127-128, 1994.
- ATKINSON, G.; REILLY, T. Circadian variation in sports performance. *Sports Med.* 21:292-312, 1996.
- BACK, F.A.; FORTES, F.S.; SANTOS, E.H.R.S.; TAMBELLI, R.; MENNA-BARRETO, L.S.; LOUZADA, F.M. Sincronização não-fótica: o efeito do exercício físico aeróbio. *Rev. Bras. Med. Esp.* 13(2), 2007.
- BAEHR, E.K.; FOGG, L.F.; EASTMAN, C.I. Intermittent bright light and exercise to entrain human circadian rhythms to night work. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277:R1598-R1604, 1999.
- BALLASTELA, A.; PISANO, G.; IORIO, S.; PASQUALI, D.; ORIO, F.; VENDITTO, T.; SINISI, A.A. Endócrino secretions under abnormal light-dark cycles and in the blind. *Horm. Res.* 49:153-157, 1998.
- BANFI, G.; ROI, G.S.; DOLCI, A.; SUSTA, D. Behaviour of haematological parameters in athletes performing marathons and ultramarathons in altitude ('skyrunners'). *Clin. Lab. Haem.* 26:373-377, 2004.
- BARGER, L.K.; WRIGH, JR, K.P.; HUGHES, R.J.; CZEISLER, C.A. Daily exercise facilitates phase delays of circadian melatonin rhythm in very dim light. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286:R1077-R1084, 2004.
- BARON, B.; NOAKES, T.D.; DEKERLE, J.; MOULLAN, F.; ROBIN, S.; MATRAN, R.; PELAYO, P. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? *Br. J. Sports Med.* 42:828-833, 2008.
- BOBRZYNSKA, K.J.; MROSOVSKY, N. Phase shifting by novelty-induced running: activity dose-response curves at different circadian times. *J. Comp. Physiol. A* 182: 251-258, 1998.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; COLLIN, F.; JORE, D.; GARDE`S-ALBERT, M. Reaction mechanism of melatonin oxidation by reactive oxygen species in vitro. *J. Pineal Res.* 50:328-335, 2011.
- BUXTON, O.M.; CALVIN, W.L.; L'HERMITEBALÉRIAUX, M.; TUREK, F.W.; CAUTER, E.V. Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that

vary with circadian phase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284:R714–R724, 2003.

BUXTON, O.M.; FRANK, S.A.; L'HERMITE-BALÉRIAUX, M.; LEPROULT, R.; TUREK, F.W. Roles of intensity and duration of nocturnal exercise in causing phase delays of human circadian rhythms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 273: E536–542, 1997.

CAIN, S.W.; RIMMER, D.W.; DUFFY, J.F.; CZEISLER, C.A. Exercise Distributed across Day and Night Does Not Alter Circadian Period in Humans. *J. Biol. Rhythms.* 22:534, 2007.

CASTELHANO-CARLOS, M.J.; BAUMANS, V. The impact of light, noise, Cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Lab. Animals*, 43: 311–327, 2009.

CHIESA, J.J.; ANGLIES-PUJOLRAS, M.; DIEZ-NOGUERA, A.; CAMBRAS, T. Activity rhythm of golden hamster (*Mesocricetus auratus*) can be entrained to a 19-h light-dark cycle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289:R998–R1005, 2005.

CIPOLLA-NETO, J.; CAMPA, A. Ritmos biológicos. In: Aires MM. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 17-9, 1991.

CLOUGH, G. Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol. Rev.* 57:487–523, 1987.

CONTARTEZE, R.V.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. A: Mol. Integr. Physiol.* 151(3):415–422, 2008.

COOP, S.W.; HIRAI, D.M.; MUSCH, T.I.; POOLE, D.C. Critical speed in the rat: implications for hindlimb muscle blood flow distribution and fibre recruitment. *J. Physiol.* 588(24):5077–5087, 2010.

DE ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 148:888–892, 2007.

DE ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; REIS, I.G.M.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 17 jun, Epub, ahead of print, 2011. PMID: 21681481.

DEPRE'S-BRUMMER, P.; BOURIN, P.; PAGES, N.; METZGER, G.; LEVI, F. Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 42:R1891–R99, 1997.

DETANICO, C.D.; SOUZA, A.; MEDEIROS, L.F.; ROZISKY, J.R.; CAUMO, W.; HIDALGO, M.P.L.; BATTASTINI, A.M.O.; TORRES, I.L.S. 24-hour temporal pattern of ntpdase and 5'-nucleotidase enzymes in rat blood serum. *Chronobiol. Int.* 27(9–10):1751–1761, 2010.

DJIK, D.J.; DAVID, F.N.; WYATT, J.K.; RONDA, J.M.; RIEL, E.; CECCO, A.R.; HUGHES, R.J.; ELLIOT, A.R.; PRISK, G.K.; WEST, J.B.; CZEISLER, C.A. Sleep, performance, circadian rhythms, and light-dark cycles during two space shuttle flights. *Am Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281:R1647-R1664, 2001.

DRUST, B.; WATERHOUSE, J.; ATKINSON, G.; EDWARDS, B.; REILLY, T. Circadian rhythms in sports performance – an update. *Chronobiol. Int.* 22:21-44, 2005.

DUBOIS, M.L.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350–356, 1956.

DUFAUX, B.; ORDER, U. Plasma elastase, alpha-1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *Int. J. Sports Med.* 10:434-8, 1989.

DUNCAN, M.D.; LAVAIL, M.M. Intense Cyclic Light–Induced Retinal Degeneration in Rats. *Arch. Ophthalmol.* 128(2):244-245, 2010.

ELLIS, C.; MOAR, K.M.; LOGIE, T.J.; ROSS, A.W.; MORGAN, P.J.; MERCER, J.G. Diurnal profiles of hypothalamic energy balance gene expression with photoperiod manipulation in the siberian hamster, *Phodopus sungorus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294:R1148-R1153, 2008.

ENGEL, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. *Anal. Biochem.* 88(2):475-484, 1978.

ESKES, G.A.; WILKINSON, M.; MOGER, W.H.; RUSAK, B. Periventricular and Suprachiasmatic lesion effects on photoperiodic responses of the hamster hupophyseal- gonadal axis. *Biology of reproduction.* 30:1073-1081, 1984.

EVERSON, C. Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav. Brain Res.* 69:43-54, 1995.

EVERSON, C.; BERGMANN, B.M.; RECHTSCHAFFEN, A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep.* 12:12-21, 1989.

FALL, M.W. The use of red light for handling wild rats. *Anim. Sci.* 24:686-687, 1974.

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: effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 34:760-765, 2007.

FILGUEIRAS, M.Q. Glândula Pineal: revisão da anatomia e correlações entre os marca-passos e fotoperíodos na sincronização dos ritmos circadianos. *HU revista, Juiz de Fora*, 32(2):47-50, 2006.

FINLEY, RB Jr. Observation of nocturnal animals by red light. *J. Mammal.* 40:591-594, 1959

FONTANA, P.; BOUTELLIER, U.; KNÖPFLI-LENZIN, C. Time to exhaustion at maximal lactate steady state is similar for cycling and running in moderately trained subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 107:187–192, 2009.

FULLER, P.M.; LU, J.; SAPER, C.B. Differential Rescue of Light- and Food-Entrainable Circadian Rhythms. *Science*. 320(5879):1074-1077, 2008.

GANDER, P.H.; MOORE-EDE, M.C. Light-dark masking of circadian temperature and activity rhythms in squirrel monkeys. *Am. J. Physiol.* 245:R927-R934, 1983.

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*. 43:725-6, 1991.

GOBATTO, C.A.; MANCHADO-GOBATTO, F.B.; Carneiro, L.G.; de ARAUJO, G.G.; dos REIS, I.G.M. Maximal lactate steady state for aerobic evaluation of swimming mice. *Comp. Exerc. Physiol.* 6:99-103, 2009.

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. A. Mol. Integr. Physiol.* 130:21–27, 2001.

HALBERG, F.; CARANDENTE, F.; CORNÉLISSEN, G.; KATINAS, G. Glossary of chronobiology. *Chronobiologia*. 4: 1-189, 1977.

HARA, M.; ABE, M.; SUZUKI, T.; REITER, R.J. Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. *Pharmacol. Toxicol.* 78(5):308–312, 1996.

HARRINGTON, M.E.; RAHMANI, T.; LEE, C.A. Effects of damage to SCN neurons and efferent pathways on circadian activity rhythms of hamsters. *Brain Res. Bull.* 5-6:655-669, 1993.

HENRY, R. J.; CANNON, D.C.; WILKEMAN, J. Clinical chemistry, principles and techniques. 2.ed. New York: Harper and Harper Row Publishes, 1974.

HERWIG, A.; WILSON, D.; LOGIE, T.J.; BOELEN, A.; MORGAN, P.J.; MERCER, J.G.; BARRET, P. Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296:R1307-R1315, 2009.

IKEDA, M.; SAGARAB, M.; INOUÉ, S. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 279:185-189, 2000.

IKONOMOV, O.C.; STOYNEV, A.G.; SHISHEVA, A.C. Integrative coordination of circadian mammalian diversisy: neuronal networks and peripheral clocks. *Progress in Neurobiology.* 54: 87-97, 1998.

ILNEROVÁ, H.; VANĚECCEK, J.; KŘEČEK, J.; WETTERBERG, L.; SÄÄF, J. Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin *N*-acetyltransferase and melatonin. *J. Neurochem.* 32 (2):673-675, 1979.

JACOBS, G.H.; FENWICK J.A.; WILLIAMS, G.A. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J. Exp. Biol.* 204:2439–2446, 2001.

JACOBS, G.H.; NEITZ, J.; DEEGAN, J.F. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature.* 353:655–6, 1991.

JOHNSON, R.F.; JOHNSON, A.K. Drinking after osmotic challenge depends on circadian phase in rats with free-running rhythms. *Am. J. Physiol.* 261(2):R334-338, 1991.

JOHNSON, R.F.; JOHNSON, A.K. Light-dark cycle modulates drinking to homeostatic challenges. *Am. J. Physiol.* 259(2):R1035-R1042, 1990.

KJAER, M. Hepatic fuel metabolism during exercise. In: *Exercise Metabolism*, M. Hargreaves, ed. Human Kinetics, Leeds, 73–98, 1995.

KNIGHT, J.A.; THOMPSON, S.; RABOUD, J.M.; HOFFMAN, B.R. Light and Exercise and Melatonin Production in Women. *Am. J. Epidemiol.* 162(11), 2005.

KOOLHAAS, J.M. The laboratory rat. In: Poole T, ed. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals: Terrestrial Vertebrates*. 7th edn. Oxford: Blackwell Science. 313–30, 1999.

KOTEJA, P.; SWALLOW, J.G.; CARTER, P.A.; GARLAND, T. Different effects of intensity and duration of locomotor activity on circadian period. *J. Biol. Rhythms.* 18; 491, 2003.

LAVAIL, M.M. Survival of some photoreceptors in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 15:64–70, 1976.

LAX, P.; SALVADOR, Z.; JUAN, A.M. Coupling effect of locomotor activity on the rat's circadian system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275:R580–R587, 1998.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios – Conceitos fundamentais de neurociência, segunda edição. Editora Atheneu, Rio de Janeiro–RJ, 2010.

LEPROULT, R.; COMPINSCHI, G.; BUXTON, O.; VAN CAUTER, E. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep.* 20:865-870, 1997.

- LIPPI, G.; BANFI, G.; MONTAGNANA, M.; SALVAGNO, G.L.; SCHENA, F.; GUIDI, G.C. Acute variation of leucocytes counts following a half-marathon run. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 32:117–121, 2010.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-75, 1951.
- MACKINNON, L.T. Immunity in athletes. *Int. J. Sports Med.* 18:S62-S68, 1997.
- 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* 8:29–35, 2005.
- MARTINEZ, R.; GARCIA, A.M.B.; MORATO, S. Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. *Estudos de psicologia.* 10(2):239-245, 2005.
- MAZEPA, R.C.; CUEVAS, M.J.; COLLORADO, O.S.; GONZALEZ-GALLEGU, J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sciences.* 66(2):153-60, 2000.
- MCARDLE, W.D.; MONTTOYE, H.J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J. Appl. Physiol.* 21(4):1431-1434, 1966.
- McCOMACK, C.E.; SONTAG, C.R. Entrainment by red light of running activity and opvulation rhythms of rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 128:R450-453, 1980.
- MOORE, R.Y.; EICHLER, V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhyth, following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42:201–206, 1972.
- MOORE-EDE, M.C. The circadian timing system in mammals: two pacemarkers preside over many secondary oscillators. *Fed. Proc.* 42, 2802-2808, 1983.
- MURPHY, P.J.; BADIA, P.; MYERS, B.L.; BOECKER, M.R., WRIGHT JR, K.P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect normal sleep patterns in humans. *Physiology & Behavior.* 55(6):1063-1066, 1994.
- NIEMAN, D.C.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L. The immune response to exercise. *Semin. Hematol.* 31:166-79, 1994.
- NOGUEIRA, D.M. Métodos de bioquímica clínica: técnicas e interpretação. São Paulo: Pancast, 1990.
- NORTHOFF, H.; WEINSTOCK, C.; BERG, A. The cytokine response to strenuous exercise. *Int. J. Sports Med.* 15:S167-71, 1994.
- OLIVEIRA, A.C.; D'ALMEIDA, V.; HIPÓLIDE, D.C.; NOBREGA, J.N.; TUFIK, S. Sleep deprivation reduces total plasma homocysteine levels in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80:193-197, 2002.

OTTENWELLER, H.E.; TAPP, W.N.; NATELSON B. Phase-shifting the light-dark cycle resets the food-entrainable circadian pacemaker. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 258:R994-R1000. 1989.

PARDONO, E.; SIMÕES, H.G.; CAMPBELL, C.S.G. Efeitos de variações metodológicas sobre a identificação do lactato mínimo. *Rev. Bras. Educ. Física Esp.* 19:25-33, 2005.

PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. *Comp. Biochem. Physiol. A, Mol. Integr. Physiol.* 106:285-289. 1993.

POULIS, J.; ROELFSEMA, F.; HEIDE, D.V.D.; SMEENK, D. Resynchronization patterns for urinary rhythms in rats after light-dark shifts. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 249:R402-R409, 1985.

PRENDERGAST, B.J.; BAILLIE, S.R.; DHABHAR, F.S. Gonadal hormone-dependent and -independent regulation of immune function by photoperiod in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294:R384–R392, 2008.

RALPH, M.R.; FOSTER, R.G.; DAVIS, F.C.; MENAKER, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science.* (247):975-978, 1990.

REETH, V.O.; STURIS, J.; BYRNE, M.M.; BLACKMAN, J.D.; L'HERMITE-BALERIAUX, M.; LEPROULT, R.; OLINER, C.; REFETOFF, S.; TUREK, F.W.; CAUTER, E.V. Nocturnal exercise phase delays circadian rhythms of melatonin and thyrotropin secretion in normal men. *Am. J. Physiol. Endoc. Metal.* 266(29):E964-E974, 1994.

REGOW, B.J.M.; CORNELISSEN, P.J.H.C.; HELDER, R.A.P.; SPIJKERS, J.B.F.; WEEBER, Y.M.M. Specific determination of free fatty acid in plasm. *Clinica Chimica Acta*, 31(1):187-195, 1971.

REILLY, T.; BROOKS, G.A. Investigation of circadian rhythms in metabolic responses to exercise. *Ergonomics* 25:1093–1107, 1982.

REILLY, T.; WATERHOUSE, J. Sports performance: is there evidence that the body clock plays a role? *Eur. J. Appl. Physiol.* 106:321–332, 2009.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; GITTO, E.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; LEON, J.; MANCHESTER, L.C.; VIJAYALAXMI, K.E.; KILIC, U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol. J. Pharmacol.* 56:159–170, 2004.

RIBEIRO, L.F.P.; GONÇALVES, C.G.S.; KATER, D.P.; LIMA, M.C.S.; GOBATTO, C.A. Influence of recovery manipulation after hyperlactemia induction on the lactate minimum intensity. *Eur. J. Appl. Physiol.* 105:159–165, 2009.

RICHTER, C.P. A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monogr.* 1, 1922.

ROSA, L.F.P.B.C.; VAISBERG, M.W. Influências do exercício na resposta imune. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 8(4):167-72, 2002.

RUSAK, B.; ZUCKER I. Neural regulation of circadian rhythms. *The American physiological society.* 59(3), 1979.

SCHWARTZ, W.J.; REPPERT, S.M.; EAGAN, S.M.; MOORE-EDE, M.C. In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res.* (5): 184-7, 1983.

SEMPLE-ROWLAND, S.L.; DAWSON, W.W. Retinal cyclic light damage threshold for albino rats. *Lab. Anim. Sci.* 37:289-98, 1987.

SHEPHARD, R.J.; HEK, P.N. Potential impact of physical activity and Sport on the immune system – A brief review. *Br. J. Sports Med.* 28:247-55, 1994.

SILVA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, A.M.; ARAUJO, J.F. Light-dark cycle synchronization of circadian rhythm in blind primates. *J. Circ. Rhythms.* 6(3):10, 2005.

SOLBERG, C.; HORTON, T.H.; TUREK, F.W. Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276(45): R152 – R161, 1999.

SPATCH-SCHWALBE, E.; HUNDENBORN, C.; KERN, W.; FEHM, H.; BORN, J. Nocturnal wakefulness inhibits growth hormone (GH) releasing hormone-induced GH secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:214-219, 1995.

STEPHAN, F.K.; ZUCKER, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 1583-1586, 1972.

SUN, J.H.; YAGA, K.; REITER, R.J.; GARZA, M.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; POEGGILER, B. Reduction in pineal N-acetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels in rats after their exposure to red light at night. *Neurosci Lett.* 149(1):56-8, 1993.

SZEL, A.; ROHLICH, P. Two cone types of rat retina detected by antiviral pigment antibodies. *Exp. Eye Res.* 55:47-52, 1992.

TAN, D.X.; POEGGILER, B.; REITER, R.J.; CHEN, L.D.; CHEN, S.; MANCHESTER, L.C.; BARLOW-WALDEN, L.R. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 70:65-71, 1993.

TANAKA, H.; YANASE, M.; KANOSUE, K.; NAKAYAMA, T. Circadian variation of thermoregulatory responses during exercise in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 258:836-841, 1990.

TANG, I.; MURAKAMI, D.M.; FULLER, C.A. Effects of square-wave and simulated natural light-dark cycles on hamster circadian rhythms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276:1195-1202, 1999.

TEGTBUR, U; BUSSE, MW; BRAUMANN, KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25:620-627, 1993.

TOSINI, G.; AGUZZI, J.; BULLOCK, N.M.; LIU, C. KASAMATSU, M. Effect of photoreceptor degeneration on circadian photoreception and free-running period in the Royal College of Surgeons Rat. *Brains Res.* 1148: 76-82, 2007.

USUI, S.; OKASAKY, T.; HONDA, Y. Interruption of the rat circadian clock by short light-dark cycles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284:R1255-1259, 2003.

USUI, S.; TAKAHASHI, Y.; OKAZAKI, T. Range of entrainment of rat circadian rhythms to sinusoidal light-dark cycles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278: R1148-R1156, 2000.

VALENTINUZZI, V.S.; KOLKER, D.E.; VITATERNA, M.H.; FERRARI, E.A.M.; TAKAHASHI, J.S.; TUREK, F.W. Effect of Circadian Phase on Context and Cued Fear Conditioning in C57BL/6J Mice. *Animal Learning & Behavior.* 29(2):133-142, 2001.

VAN LUIJTELAAR, E.L.J.M.; COENEN, A.M.L. An EEG averaging technique for automated sleep-wake stage identification in the rat. *Physiology & Behavior.* 33:837-841, 1983.

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.* 35, 1–6, 2002.

VOSKO, A.M.; HAGENAUER, M.H.; HUMMER, D.L.; LEE, T.M. Period gene expression in the diurnal degu (*Octodon degus*) differs from the nocturnal laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296:R353-R361, 2009.

WEE, R.; CASTRUCCI, A.M.; PROVENCIO, I.; GAN, L.; VAN GELDER, R.N. Loss of photic entrainment and altered free-running circadian rhythms in *math5*^{-/-} mice. *J. Neurosci.* 1(23):10427-10333, 2002.

YAMANAKA, Y.; HONMA, S.; HONMA, K. Scheduled exposures to a novel environment with a running-wheel differentially accelerate re-entrainment of mice peripheral clocks to new light–dark cycles. *Genes to Cells* 13, 497–507, 2008.

YANNIELLI, P.; HARRINGTON, M.E. Let there be “more” light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photoc pathways. *Prog. Neurobiol.* 74:59-76, 2004.

YOUNGSTEDT, S.D.; KRIPKE, D.F.; ELLIOTT, J.A. Circadian phase-delaying effects of bright light alone and combined with exercise in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282:259-266, 2002.

10. APÊNDICES

10.1. METHODS OF EXERCISE INTENSITY AND LACTATEMIA DETERMINATION IN LACTATE MINIMUM TEST IN RATS

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare three different methods to determine the effort intensity (LMT_i) and lactatemia (LMT_{LAC}) corresponding to lactate minimum test (LMT). Seventeen rats underwent LMT in swimming starting by the induction phase followed by an incremental phase after 9 minutes of recovery, with a workload of 4 %bw and increments of 0.5 %bw every 5 minutes up to 7 %bw. Elicited these data was possible to establish the LMT_i (%bw) and LMT_{LAC} (mM) by three methods: Visual inspection (VI), second order polynomial function (f_{POLY}) and spline function (f_{SPL}). The data were analyzed by ANOVA one-way for repeated measures with Newmann Keuls post hoc test and Pearson correlation test, with significance levels of 5% for all. No significant difference were found between LMT_i and LMT_{LAC} using the method VI (5.32 ± 0.50 %bw and 5.62 ± 0.78 mM), f_{POLY} (5.31 ± 0.53 %bw and 5.64 ± 0.72 mM) and f_{SPL} (5.32 ± 0.54 %bw and 5.59 ± 0.76 mM). Significant correlations were found between the three methods employed. Through these results, we concluded that determination of intensity and lactate concentration corresponding to LMT in swimming with sedentary rats not seems to be influenced by mathematic or non mathematic method.

Keywords: Lactate minimum. Wistar rat. Swimming.

INTRODUCTION

The identification of maximal effort intensity in which occurs a balance between production and removal of blood lactate concentration has been extensively discussed in recent studies and received broadly physiological importance (FERREIRA et al., 2007; CONTARTEZE et al., 2008). The gold standard procedure for assessing aerobic capacity is the maximal lactate steady-state (MLSS), which depends on about 4 days, being not feasible in some training routines. Given this inadvisable characteristics of MLSS, Tegtbur et al. (1993) developed the lactate minimum test (LMT) which comprises in induce a state of hyperlactatemia preceding an incremental test. From the kinetics analysis of intensity versus lactatemia

relationship, Tegtbur et al. (1993) adopted a mathematical procedure (spline function) to determine the lowest lactate concentration detected during incremental phase to estimating the same intensity as found by the test of maximal lactate steady-state (BACON & KERN, 1999). Moreover, just applying LMT once, can assess both anaerobic and aerobic pathway in a single test, beyond independence of previous nutritional status (TEGTBUR et al., 1993) with high reliability and validity (DOTAN et al., 2011).

Despite Tegtbur et al. (1993) originally use the spline function to construct the intensity (LMT_i) versus lactatemia (LMT_{LAC}) graph curve, some researchers have conducted these analysis employing the second order polynomial adjust (f_{POLY}) (RIBEIRO et al., 2009) or visual inspection method (VI) (PARDONO et al., 2005). Despite several studies have investigated the methodological variations of LMT, as different procedures for induction to hyperlactatemia (DE ARAUJO et al., 2007), different stage length in incremental phase (RIBEIRO et al., 2003), variations in recovery moment (RIBEIRO et al., 2003) and training effects at LMi (DE ARAUJO et al., 2011), few studies aimed to check possible differences between mathematical procedures or non-math adopted to determine the LMT_i and LMT_{LAC}, which if positive, could directly affect the comparison between the studies cited. Understanding that the animal model shows, among other advantages, the greatest possibility of the control of the test, the purpose of this study was to compare the use of visual inspection method (VI), second order polynomial function (f_{POLY}) and spline function (f_{SPL}) to determine the effort intensity and lactatemia corresponding to anaerobic threshold by means of the LMT applied to swimming exercise in rats. Just as results by human model of investigation (RIBEIRO et al., 2003; SMITH et al., 2002), the hypothesis of this research is that there are not differences between the procedures (not mathematicians or mathematician) addressed when analyzing the animal model using sedentary rats.

MATERIALS AND METHODS

Seventeen male rats Wistar (60 days OLD) obtained from the UNESP Central Bioterium and kept at the Bioterium of the Biodynamic Laboratory were employed in this investigation. The animals were maintained in polypropylene cages (five rats per cage) and kept at room temperature of 22 ± 1 °C, photoperiod 12 hours light / dark

and fed with standard balanced ® Purina laboratory and water *ad libitum*. The experiment was conducted according to current Brazilian legislation and standards of the Brazilian College of Animal Experimentation - COBEA (Law nr. 6638, May 8th, 1979 decree nr 24,645, July 10th, 1934) were strictly followed. The Project was approved by Ethics Committee on the Use of Animals of Bioscience Institute of Sao Paulo State University under protocol number 018/2010.

The experiment was developed after an adaptation period of two weeks to the aquatic environment consisting of 30 minutes daily. This adaptation occurred in tanks (80 cm diameter X 120 cm deep), divided into four cylindrical PVC tubes having a diameter of 30 cm (X 120 cm deep) and the water temperature maintained at 31 ± 1 °C. This tank division was established to maintain only one animal at a time and preserve it standard of swimming.

The rats underwent LMT according Araujo et al. (2007), who suggested the induction of metabolic acidosis in two bouts (firstly 30s and later until exhaustion) with an overload of 13%bw for both, separated by 30 seconds. During 9 minutes recovery were obtained blood samples at 7 and 9 minutes to determine lactate peak before starting incremental phase, which was performed with initial overload of 4%bw and increments of 0.5%bw every 5 minutes, until 7%bw. During intervals the animals were kept in shallow water at an identical temperature of the tank to avoid heat stress. Fig 1 illustrates the phases corresponding to the LMT, being the incremental phase the target of curve analysis obtained between lactate concentration and intensity of effort.

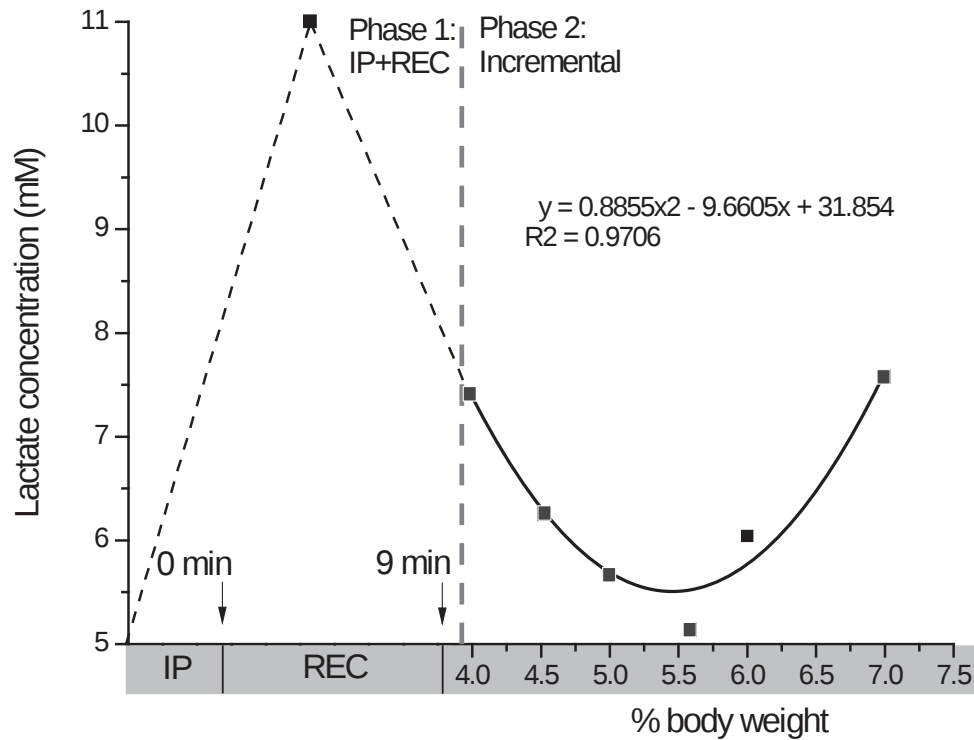


FIGURE 1. Schematic illustration of the LMT, representing the phase 1 - induction phase (IP) and 9 minutes of recovery (REC), and phase 2 called as incremental phase. The data correspond to the rat 2 of the experiment and the figure shows the polynomial fit (black line and in presenting his equation).

For the determination of lactate concentration, blood samples of 25 μL were taken from the distal portion of the animal's tail using calibrated capillary tubes. Samples were transferred to plastic tubes of 1.5 mL containing 50 μL of sodium fluoride (1%) and analyzed by electrochemical method (YSI 1500 Sport, Yellow Springs Co., USA).

Once performed LMT, data from incremental phase was used to determine LMT_i and LMT_{LAC} by three manners: a) visual inspection method (VI): Without any mathematical procedure such determination was performed by visual inspection of the point with lower lactate concentration found and considering for the interpolation of axis X and Y (intensity and lactate respectively) (SIMÕES et al., 1999; RIBEIRO et al., 2003); b) second order polynomial adjust (f_{POLY}): from the equation generated was determined the zero derivative, that represents LMT_{LAC} (lower Y axis value) and LMT_i (Y minimum value interpolated to X axis) (DE ARAUJO et al., 2007); c) cubic

spline function (f_{SPL}): was determined zero gradient corresponding to the adjustment constructed by the cubic spline function and used as f_{POLY} (TEGTBUR et al., 1993; CARTER et al., 1999; 2000). For determination of polynomial and spline methods were used the software MATLAB, supported by Microsoft Windows, XP version. Figure 2 shows representative graphs of the visual inspection method (A), polynomial fit (B) and spline function (C) of the rat 2 of the experiment.

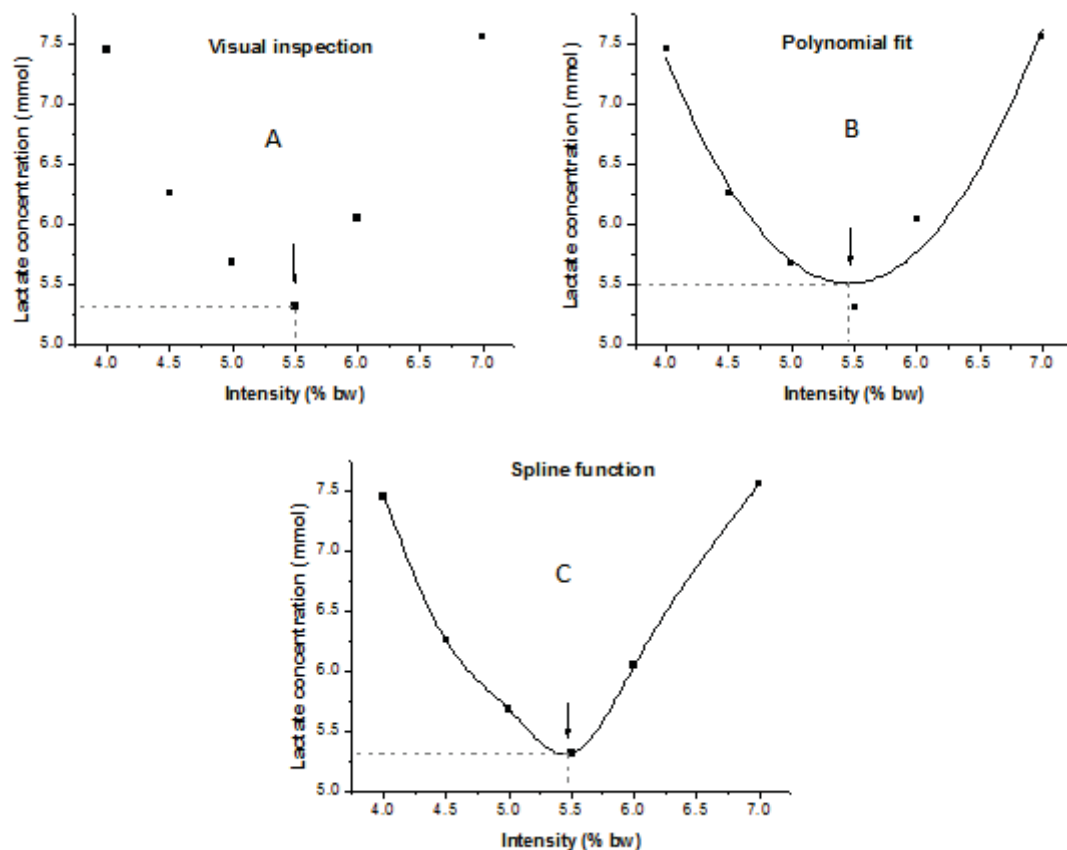


FIGURE 2. Graphical representation of the determinations using the visual inspection method (A), fit second order polynomial (B) and spline function (C).

Statistical analysis

All samples were submitted to the Shapiro-Wilk test to check the standards of normality. Once deemed normality for all data, parametric statistics was employed. One-way ANOVA for repeated measures followed by post hoc Newmann-Keuls were used for comparisons beyond the Pearson correlation test. In all cases was used the software BioEstat 4.0 (supported by Microsoft Windows, XP version) and was set a significance level of 5%.

RESULTS

The lactate peak was equal to $7.96 \pm 1.82\text{mM}$. No differences were found between lactate concentration and intensity corresponding to anaerobic threshold determined by the LMT through the three proposed methods, confirming the hypothesis of this study. Table 1 describes the results in mean $\pm$ standard deviation of the LMT variables determined by the three proposed procedures.

Table 1. Results of the lactatemia (LMT_{LAC} [mM]) and intensity (LMT_i [%bw]) of lactate minimum test, determined by visual inspection (Lac_{VI} ; $\text{Intens}_{\text{VI}}$), second order polynomial (Lac_{POLY} ; $\text{Intens}_{\text{POLY}}$) and spline function (Lac_{SPL} ; $\text{Intens}_{\text{SPL}}$), respectively.

Lac_{IV} (mM)	Lac_{poli} (mM)	Lac_{spl} (mM)	Intens_{IV} (%bw)	Intens_{poli} (%bw)	Intens_{spl} (%bw)
5.62$\pm$	5.64$\pm$	5.59$\pm$	5.32$\pm$	5.31$\pm$	5.32$\pm$
0.78	0.72	0.76	0.50	0.53	0.54

Correlations were found for all data crossing between each LMT variables. Among VI and f_{POLY} correlation coefficient was $r = 0.97$ and $r = 0.89$ for LMT_{LAC} and LMT_i , respectively. Between VI and f_{SPL} the correlations were $r = 0.99$ for lactate concentration and $r = 0.75$ for the intensities. Between f_{POLY} and f_{SPL} were $r = 0.96$ and $r = 0.79$ for lactate concentrations and intensities, respectively.

DISCUSSION

The main finding of this study was the equality found between visual and mathematical procedures used to determine the intensities and concentrations of LMT, as hypothesized.

Although many studies that address the LMT in the literature, only Smith et al. (2002) mapped comparisons between the three methods most employed to determine the LMT variables, not finding significant differences between the procedures utilized. Beyond this study, Sotero et al. (2007) compared the use of f_{POLY} with VI also stating no significant differences, as Ribeiro et al. (2003) investigating f_{SPL} and VI. Regarding these studies, are advisable to observe the use of samples with different physical conditions and sports specialization.

The animal model has been widely used by researches because it brings several advantages in terms of handling, maintenance at bioterium and possibility of control of environmental factors and monitoring of physiological parameters on constant manner, certification as to the genetic pattern, besides the possibility of many interventions. For this reason our group standardized the MLSS in Wistar rats to swimming (GOBATTO et al., 2001) and treadmill exercise (MANCHADO et al., 2005).

The LMT for rats was proposed by Voltarelli et al. (2002) and was also standardized for horses by Gondim et al. (2007), but in animal model, only Araujo et al. (2007) compared different methods for determining the LMT variables, employing Wistar rats and stated no significant difference between the method VI and f_{POLY} . Despite this, the results of our investigation corroborate the reports related to human studies, where the procedures used for the determination of LMTi showed no significant differences (SMITH et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003). Furthermore, our data are close to the values shown by Voltarelli et al. (2002) and Araujo et al. (2007) that found intensities corresponding to $4.95 \pm 0.10\%bw$ and $5.17 \pm 0.47\%bw$.

Each method applied to determine the LMTi and LMT_{LAC} presents a particularity. The application of f_{POLY} is characterized by smooth the set of signals. However, adjustment for spline function has the characteristic of causing further approximation of all plotted points. Therefore this setting just approaches the phenomenon that occurs in the VI, which considers only one point of the whole data. This explains the great similarity in results between these two methods (VI and f_{SPL}).

Tegtbur et al. (1993) reported that the kinetics of lactate concentration found before the various intensities applied during the incremental phase of LMT shows a similar behavior in “U”. This kinetic is expressed graphically when one plots the dependent variable (lactate – Y axis) for the independent variable (load – X axis) at a frequency corresponding to one point every 5 minutes of exercise as in our study, or one point every 3 minutes as the study of Tegtbur et al. (1993). It seems that the low frequency of points that support the graphical construction resulted in a low sensitivity to show statistically significant differences, leading us to understand that to find a significant difference between the variables calculated by the various models

would require a larger number of points during the incremental test. As suggestion for futures studies, the investigation of these three different methods in trained animals would be interesting.

According to the hypothesis established, the present study showed that the use of VI, f_{POLY} or f_{SPL} appear to represent the same condition to determine the LMTi and LMT_{LAC}, in sedentary rats in swimming.

REFERENCES

- BACON, L.; KERN, M. Evaluating a test protocol for predicting maximum lactate steady state. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 39:300-308, 1999.
- CARTER, H.; JONES, A.M.; DOUST, J.H. Effect of incremental test protocol on the lactate minimum speed. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 31:837–845, 1999.
- CARTER, H.; JONES, A.M.; DOUST, J.H. Changes in blood lactate and pyruvate concentrations and the lactate-to-pyruvate ratio during the lactate minimum speed test. *Journal of Sports Sciences* 18, 213- 225, 2000.
- CONTARTEZE, R.V.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. A: Mol. Integ. Physiol.* 151(3):415-422, 2008.
- de ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 148:888 - 892, 2007.
- de ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; REIS, I.G.M.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 17 jun, Epub, ahead of print, 2011. PMID: 21681481.
- DOTAN, R.; ZIGEL, L.; ROTSTEIN, A.; GREENBERG, T.; BENYAMINI, Y.; FALK, B. Reliability and validity of the lactate-minimim test. *Journal of sports medicine and physical fitness* 51, 42-49, 2011.
- 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: effect of exercise training. *Clinical and Experimental Pharmacology and physiology* 34:760-765, 2007.
- GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 130:21–27, 2001.
- GONDIM, F.J.; ZOPPI, C.C.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MACEDO, D.V. Determination of the anaerobic threshold and maximal lactate steady state speed in equines using

the lactate minimum speed protocol. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146, 375–380, 2007.

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* 8:29–35, 2005.

PARDONO, E.; SIMÕES, H.G.; CAMPBELL, C.S.G. Efeitos de variações metodológicas sobre a identificação do lactato mínimo. *Revista Brasileira de Educação física e esporte* 19:25-33, 2005.

RIBEIRO, L.F.P.; BALIKIAN, P.; MALACHIAS, P.; BALDISSERA, V. Stage length, spline function and lactate minimum swimming speed. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 43:312-318, 2003.

RIBEIRO, L.F.P.; GONÇALVES, C.G.S.; KATER, D.P.; LIMA, M.C.S.; GOBATTO, C.A. Influence of recovery manipulation after hyperlactemia induction on the lactate minimum intensity. *European Journal of Applied Physiology* 105:159–165, 2009.

SIMÕES, H.G.; CAMPBELL, C.S.G.; KOKUBUN, E.; DENADAI, B.S.; BALDISSERA, V. Blood glucose responses in humans mirror lactate responses for individual anaerobic threshold and for lactate minimum in track tests. *European Journal of Applied Physiology* 80: 34-40, 1999.

SMITH, M.F.; BALMER, J.; COLEMAN, D.A.; BIRD, S.R.; RICHARD-DAVISON, R.C. Method of lactate elevation does not affect the determination of the lactate minimum. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 34:1744–1749, 2002.

SOTERO, R.C.; CAMPBELL, C.S.G.; PARDONO, E.; PUGA, G.M.; SIMÕES, H.G. Polynomial adjustment as a new technique for determination of lactate minimum velocity with blood sampling reduction. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano* 9:327-332, 2007.

TEGTBUR, U.; BUSSE, M.W.; BRAUMANN, K.M. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Medicine & Science in Sports & Exerc* 25:620-627, 1993.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Medical Biological Res.* 35, 1–6, 2002.

10.2. TIME TO EXHAUSTION AT MAXIMAL AEROBIC CAPACITY IN RATS: GLYCOGEN-BASED STUDY OF FATIGUE

ABSTRACT

The mechanisms of exercise exhaustion are an important question in exercise physiology, and animal models are extensively used. Although it is extremely important that animal model studies apply strict and individual exercise intensity control, such data are lacking. We submitted rats to swimming at lactate minimum intensity until exhaustion and analyzed the glycogen content of ten individual muscles, as well as liver and serum parameters. Our results show that this model of glycogen based study is an appropriate tool for future studies that will further our understanding of exercise exhaustion.

Keywords: Rat. Glycogen. Hindlimb. Exhaustion. Lactate minimum intensity. Fatigue model. Time to exhaustion.

INTRODUCTION

The exhaustion mechanisms of physical exercise have been investigated since the 1920s and are still actively researched today (MACINTOSH & SHAHI, 2011). Some authors have associated the inability to continue exercise at the required intensity to a lack of energetic substrates, mainly glycogen depletion (COYLE et al., 1986; FEBBRAIO & DANCEY, 1999). Baron et al. (2008) explained this phenomenon through the complex theory of central governor, a theory that was contested by Shepard (2009), and others have proposed a collaboration between physiological systems and the brain (LAMBERT et al., 2005). To test this hypothesis during maximal aerobic capacity (MAC) exercise, it is necessary to use a methodological design that involves invasive procedures that are inappropriate for human study, such as biopsying several muscles or using magnetic resonance spectroscopy for glycogen depletion identification. In addition, these methods are considered “expensive, very complex and very difficult” (BOESCH 2007). Furthermore, the type of exercise may be problematic, as in studies that utilize swimming.

Animal models are widely used and are an excellent way to study physiological, cardiovascular, pulmonary and metabolic mechanisms modulated by physical exercise (COOP et al., 2009). In this context, swimming is a natural rat ability, and protocols with this ergometer have been employed since the 1960s (MCARDLE & MONTOYE, 1966). Nevertheless, the objective and individual control of exercise intensity in rats only came to researchers' attention in the last several years (GOBATTO et al., 2001; VOLTARELLI et al., 2002; MANCHADO et al., 2005; De ARAUJO et al., 2007; De ARAUJO et al., 2011). Blood lactate is a biochemical parameter used to estimate the relative exercise intensity and the Lactate Minimum Test (LMT) enables the determination of MAC, in a single day in both humans (BACON & KERN 1999; DOTAN et al., 2011) and rats (VOLTARELLI et al., 2002; De ARAUJO et al., 2007).

Several studies have assessed the time to exhaustion (TTE) at MAC in humans. This data can be useful to prescribe training volume. However, the TTE at MAC (TTE_{MAC}) is unknown in rats, so the appropriate training protocol cannot be calculated. Glycogen is the primary energy substrate during MAC (BENEKE et al., 2000), and its depletion is likely the principal factor preventing continued aerobic exercise (BARON et al., 2005). There are no human studies that concurrently assess glycogen depletion in several muscles, but such questions can be asked in rats. Our previous publications show that we have the technical knowledge needed to assess MAC and induce rats to exhaustion using strictly controlled effort intensity in a swimming paradigm (GOBATTO et al., 2001; VOLTARELLI et al., 2002; MANCHADO et al., 2005; De ARAUJO et al., 2007; De ARAUJO et al., 2011).

Therefore, the aims of this study were: a) to identify the TTE_{MAC} with intensity determined by the lactate minimum test; b) to assess glycogen content in several hindlimb muscles after TTE_{MAC} and c) to verify the association between glycogen depletion and exhaustion in this rat model of exhaustion induction.

MATERIALS AND METHODS

Eighteen male Wistar rats, obtained from the central bioterium of Sao Paulo State University were assessed in this study. The animals were housed in polypropylene cages (four or five rats per cage) and kept at 22 ± 1 °C in 45 – 55 % relative humidity with noise below 80 decibels. A photoperiod of 12 hours light (6:00-

18:00 h) / 12 hours dark (18:00-6:00 h) was established, and, 60lux was the maximal light intensity inside cage. Standard food (23.5 % protein, 6.5 % fat, 70 % carbohydrate, Purina 5008, St. Louis, MO) and water were available *ad libitum*. The experiment was conducted according to current Brazilian legislation and standards of the Brazilian College for Animal Experimentation were rigorously followed (Law nr 6638, 8 May 1979; Decree nr 24,645, 10 July 1934). The Project was approved by Ethics Committee on the Use of Animals of Bioscience Institute of Sao Paulo State University under protocol number 018/2010.

Experimental procedures: The rats arrived from the central bioterium at 45 days old, and were immediately housed in the environment described above. Two weeks before turning 90 days old, they began a general adaptation period for the experimental protocol, including exposure to an aquatic environment, thermal stress, swimming in progressively deeper water (15 – 50 – 120 cm) and handling for all routines. All swimming routines occurred in a tank (30 cm diameter and 120 cm deep) containing clean water (31 ± 1 ° C). The rats were divided into control (CG) and experimental (EG) groups. All underwent the LMT (exactly as previously described in De ARAUJO et al., 2007, using protocol 4 for the induction phase) at 90 days old and were euthanized in carbon-dioxide chamber 48 hours later, either at rest (CG) or immediately after time to exhaustion swim (EG). For the determination of lactate concentration, blood samples (25 µL) were collected in heparinized capillary tubes from the distal tail. The samples were transferred to plastic tubes (1.5 mL) containing 400 µL of trichloroacetic acid (TCA – 4 %) and lactate concentration was measured at 340 nanometers (nm) against the calibration curve (ENGEL & JONES, 1978). All procedures were initiated at 20:00 h, when the body temperature and natural activity of the rat is high (TANAKA et al., 1990; IKEDA et al., 2000) and were carried out under red light (Phillips, Infrared-PAR38-E27-150W, wavelength > 600 nm (~15 lux) because albino Wistar rats are photosensitive (SUN et al., 1993; JACOBS et al., 2001). This time of day was selected by considering the optimum circadian period in order to minimize animal stress (PITTENDRIGH & DAAN, 1976).

The TTE, performed only by EG, corresponds to one bout of exercise at lactate minimum intensity (called Maximal Aerobic Capacity) until it can no longer be sustained (task failure). TTE is verified when the rat remains submerged for at least 15 seconds despite vigorous attempts to emerge (MCARDLE & MONTROYE, 1966).

These routines were conducted by the same two researchers, and all of the procedures described above are in agreement with the viewpoint of Booth et al. (2010). The experimental routines sequence is illustrated in Figure 1.

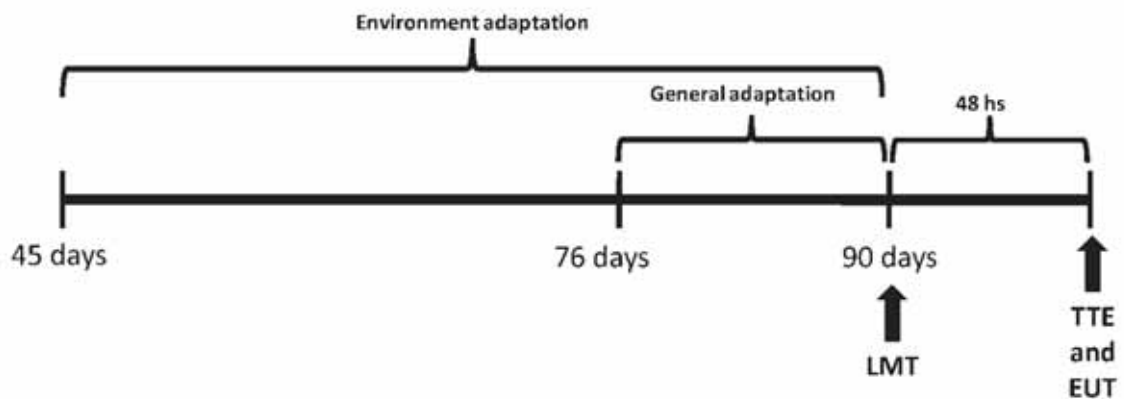


Figure. 1. Schematic summary of study design as a function of age. Forty-five-day old animals were housed at bioterium. At 76 days old, the rats were submitted to general adaptation for two weeks. At 90 days old, the lactate minimum test (LMT) was applied. After an interval of 48 h, the animals were euthanized (EUT) immediately after time to exhaustion (TTE) at lactate minimum intensity (experimental group) or at rest (control group).

Collection of biological material: Immediately after euthanasia we performed a thoracotomy followed by blood sample collection by cardiac puncture. The obtained samples were centrifuged and each serum sample was assessed for albumin (ALB), creatinine (CREAT), total protein (TP), uric acid (UA), free fat acid (FFA) and glucose (GLUC), using commercial kits. We also extracted 10 muscles: gluteus maximus (GLU), biceps femoris (BF), soleus (SO), semimembranosus (SM), vastus lateralis (VL), semitendinous (ST), vastus intermedius (VI), vastus medialis (VM), rectus femoris (RF) and gastrocnemius (GTN). The tissue samples were prepared and analyzed by spectrophotometry at 490 nm by the colorimetric method, described by Dubois et al. (1956) to determine glycogen concentration. Liver glycogen was extracted and analyzed by the same method.

Statistical Procedures: Values are means $\pm$ standard deviation. Normal Gaussian distribution of all data samples was verified with the Kolmogorov-Smirnov test before parametric statistical procedures were employed. We used independent t-tests to assess group differences in serum parameters and liver glycogen. Factorial analysis of variance (ANOVA 2x10 mixed design) was used to analyze the main effect, and

when necessary ($p < 0.05$), Newmann-Keuls post hoc tests were used to specify differences. We used the Pearson product-moment correlation test to assess relationships between variables. The significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

We found no significant difference between groups for LMT variables ($p > 0.05$) between CG and EG. Therefore, the LMT results contain data from both ($n = 18$). Data after the TTE swim (performed after LMT) are separated by group. These data and liver glycogen concentration are shown in table 1.

Table 1. LMT variables for pooled groups, TTE_{MAC} results of EG and liver glycogen concentration of control (CG) and experimental groups (EG).

Variables	Pooled data (n=18)	Control Group (n=9)	Exercised Group (n=9)
ILM (%bw)	5.09 ± 0.46	-	-
% sucess	78.95	-	-
R ²	0.93 ± 0.07	-	-
Lac peak (mM)	7.92 ± 1.19	-	-
TTE _{MAC} (min)	-	-	114.37 ± 36.23
Initial lactate (mM)	-	-	1.55 ± 0.33
Final lactate (mM)	-	-	5.80 ± 1.96
Liver Glycogen (µg/100mg)	-	50.47 ± 38.01	5.50 ± 3.50 *

$p < 0.05$ in relation to CG.

The results of serum assays performed during this experiment are shown in table 2. We observed a significant decrease in blood glucose (42.99 %) and an increase in FFA (167.12 %) when EG compared to CG ($r = - 0.82$; $p = 0.013$). However albumin, total protein, creatinine and uric acid levels were not significantly different ($p > 0.05$).

Muscle glycogen concentration was significantly affected by exercise, and ANOVA tests showed that the experimental group had a lower concentration than the control group ($F_{1,157} = 221.67$, $p < 0.01$, EG < CG). Newmann-Keuls post hoc tests demonstrated significant differences among many analyzed muscles in the CG ($p <$

0.05). However, this was not the case in the EG; there were no differences between any of the ten muscles assessed ($p > 0.05$ for all post hoc crosses). Significant differences were found in some muscles when analyzed among groups, and these values were used to calculate the percentage depletion of glycogen (%DG). The %DG for each muscle is shown in Figure 2, and the mean depletion in all muscles was 78.05 % and 89 % in liver glycogen concentration (t-test; $p < 0.01$).

Table 2. Albumin (ALB), total protein (TP), creatinine (CREAT), uric acid (UA), free fatty acid (FFA) and glucose (GLUC) serum concentrations for the control group (CG, euthanized at rest) and the experimental group (EG, euthanized immediately after time to exhaustion at lactate minimum intensity), and t-test results comparing groups (p) for same variable.

	ALB (g/dL)	TP (g/dL)	CREAT (mg/dL)	UA (mg/dL)	FFA (μ E/L)	GLUC (mg/dL)
CG	3.15 $\pm$ 0.68	6.74 $\pm$ 0.50	1.22 $\pm$ 0.37	5.20 $\pm$ 1.42	256.72 $\pm$ 108.95	137.53 $\pm$ 16.14
EG	3.48 $\pm$ 0.33	6.44 $\pm$ 0.37	1.29 $\pm$ 0.36	4.92 $\pm$ 1.82	685.75 $\pm$ 159.39 *	78.40 $\pm$ 32.91 *
p	0.20	0.17	0.69	0.73	<0.01	<0.01

$p < 0.05$ in relation to CG.

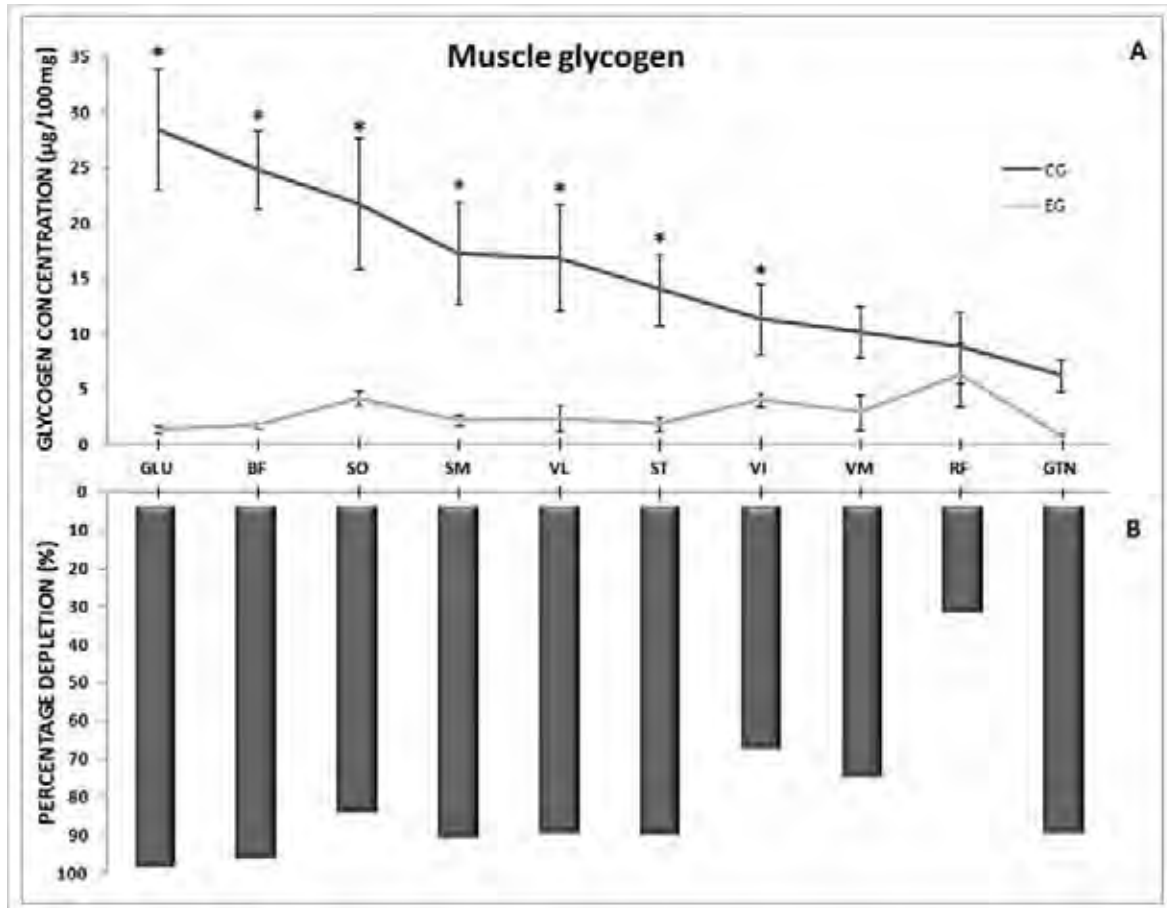
DISCUSSION

The present study identified the time to exhaustion at maximal aerobic intensity (lactate minimum intensity) in rats. We found significant glycogen depletion after this exercise.

Performance

The ability of the subject to resist fatigue is responsible for exercise duration with constant intensity (MACINTOSH & SHAHI, 2011). In humans, TTE at MAC varies from 30.0 to 65.2 min (FONTANA et al., 2009; BARON et al., 2008). Our results suggest that rats can sustain MAC longer before task failure. Although a lack of other data on rats' time to exhaustion at maximal aerobic intensity prevents any comparison, we should note that our protocol was implemented at an ideal point in

the rat circadian rhythm (night), under objective intensity control and red light. It is possible that these conditions caused less stress in the animals (PITTENDRIGH & DAAN, 1976).



* $p < 0.05$ in relation to EG (p value below);

Figure. 2. (A) Glycogen content ($\mu\text{g}/100\text{mg}$) of gluteus maximus (GLU; $p < 0.01$), biceps femoris (BF; $p < 0.01$), soleus (SO; $p < 0.01$), semimembranosus (SM; $p < 0.01$), vastus lateralis (VL; $p < 0.01$), semitendinous (ST; $p < 0.01$), vastus intermedius (VI; $p < 0.01$), vastus medialis (VM; $p = 0.086$), rectus femoris (RF; $p = 0.245$) and gastrocnemius (GTN; $p = 0.705$) of control group (CG and experimental group (EG); (B) Percentage of glycogen depletion (%DG), considering initial glycogen content of CG and final glycogen content of EG.

The relatively high TTE_{MAC} in rats may be due to the fact that the rats really must swim until exhaustion, whereas humans can stop because any discomfort in laboratory tests, at any time. Despite studies using LMT aerobic parameters for rat training prescriptions designed to enhance performance or for drug-free diseases treatment (DE ARAUJO et al., 2011; De ARAUJO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010), the literature does not contain data regarding TTE_{MAC} . These results of our

study may be useful for volume training prescription, where ~50% of TTE at lactate minimum intensity in swimming rats represents approximately 55-60 minutes.

Serum parameters

Serum total protein and albumin levels after TTE suggest that there were no changes in nutritional status or hydration (LUCIANO & MELLO, 1999), which allowed us to reject these parameters as factors that limit continued exercise. Creatinine scores were also not significantly affected by exercise either, so the TTE paradigm did not induce acute kidney problems or significantly alter creatinine metabolism.

Another parameter analyzed was uric acid (UA), which arises due to an inadequate rephosphorylation rate of ADP (adenosine diphosphate) to ATP (adenosine triphosphate) resulting in an increased concentration of AMP (adenosine monophosphate) (ROSSI & TIRAPGUI, 1999), which is likely converted to IMP (inosine monophosphate) and finally to UA (KUIPERS, 1998). Nevertheless, UA values in our study did not suggest a significant difference between groups, leading to hypothesize that the cycle was not complete. Serum parameters showed that protein metabolism remained unchanged after TTE at lactate minimum intensity.

Unlike protein parameters, glucose and lipids levels were significantly affected by exercise. In the EG, there was a glucose decrease of 42.99% and an FFA increase of 167.12% compared to the CG. The results corroborate with the literature; during aerobic exercise, the body has a tendency to “save” glucose (WEGENER et al., 1996) as a mechanism to slow glycogen oxidation, which increases FFA levels (CURI et al., 2003). However, glycogen is the principal substrate for exercise at MAC (BENEKE et al., 2000), and blood glucose is recruited as it is depleted, which results in considerable differences one or two hours after continuous effort (POWERS & HOWLEY, 1994). Moreover, Curi et al. (2003) postulated that even when provided with FFA, muscle is unable to oxidize acetyl-CoA generated during β -oxidation, and as a consequence, ATP production is reduced. Some authors (CURI et al., 2003) have suggested that the exhaustion of the Krebs cycle is a determining factor of exercise exhaustion.

Glycogen depletion

Lactate concentration is not responsible for fatigue at MAC (NIELSEN et al., 2001) and Baron et al. (2008) postulated that fatigue at maximal lactate steady state does not occur physiologically. Some authors postulated that failures in the muscle contraction mechanism are established before glycogen content is depleted completely (GREEN, 1991), whereas others ascribed these failures to glycogen depletion (COYLE et al., 1986; FEBBRAIO & DANCEY, 1999).

Our findings show that glycogen concentrations were different between various muscles before exercise ($p < 0.05$), likely due to their individual characteristics. Nevertheless, after performance (TTE_{MAC}), glycogen content was equal when comparing all muscles ($p > 0.05$). These results suggest uniform glycogen depletion, regardless of muscle fiber type. This dramatic glycogen depletion could be responsible for the observed blood glucose, which interfere with central nervous system function and leads to fatigue via mechanisms that are not entirely understood (AMENT & VERKERKE, 2009).

Grounded in the nomenclature described by Peter et al. (1972), rat hindlimb muscle fibers are 76% of glycolytic (IIb), 19% oxidative glycolytic (IIa) and 5% oxidative (I) (ARMSTRONG & PHELPS, 1984) and the progressive order of activation seems to be I, IIa and IIb (ARMSTRONG & LAUGHLIN, 1985). Neural drive it is not constant during exercise (PETERSON et al., 1988), and the recruitment of new fiber begins when others are fatigued (ARMSTRONG & LAUGHLIN, 1983). Nevertheless, this discussion is weakened by our observation that all muscles showed high glycogen depletion independent of fiber type. The mean of EG glycogen concentration, computing all muscles, was $2\mu\text{g}/100\text{mg}$, representing about 78.05% depletion and seems to be expressive. The less depleted was rectus femoris, but this muscle consists of ~99% glycolytic fibers type (ARMSTRONG & PHELPS, 1984) and retained only $6\mu\text{g} / 100\text{mg}$ of glycogen content at the end of exercise, showing an increase in neural drive (to achieve this fiber) over time at the same intensity. Gastrocnemius and vastus medialis also obtained $p > 0.05$ when comparing CG and EG, likely because their low glycogen concentration at rest (CG), generating a lack of significant statistics, however, depleting 71.59 % and 86.36 %, respectively.

These three muscles seem to be less important to swimming exercise in front of others.

CONCLUSION

The time to exhaustion at maximal aerobic intensity in swimming rats was 114.37 ± 36.23 min. We found that muscle glycogen was depleted after exercise (average value: $2 \mu\text{g}/100\text{mg}$). This result is a strong argument for glycogen depletion as a cause of exercise exhaustion at maximal aerobic intensity in swimming rats. With substantial control of exercise intensity, our study shows that the glycogen depletion is related to exhaustion. This rodent model can be further explored to understand exhaustion mechanisms.

REFERENCES

- AMENT, W.; VERKERKE, G.J. Exercise and fatigue. *Sports Med.* 39(5):389-422, 2009.
- ARMSTRONG, R.B.; LAUGHLIN, M.H. Metabolic indicators of fibre recruitment in mammalian muscles during locomotion. *J. exp. Biol.* 115:201-13, 1985.
- ARMSTRONG, R.B.; LAUGHLIN, M.H. Blood flows within and among rat muscles as a function of time during high speed treadmill exercise. *J. Physiol.* 344:189-208, 1983.
- ARMSTRONG, R.B.; PHELPS, R.O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171(3): 259-272, 1984.
- BACON, L.; KERN, M. Evaluating a test protocol for predicting maximum lactate steady state. *J. Sports. Med. Phys. Fitness.* 39(4):300-308, 1999.
- BARON, B.; DEKERLE, J.; DEPRETZ, S.; LEFEVRE, T.; PELAYO, P. Self selected speed and maximal lactate steady state speed in swimming. *J. Sports. Med. Phys. Fitness.* 45(1):1-6, 2005.
- BARON, B.; NOAKES, T.D.; DEKERLE, J.; MOULLAN, F.; ROBIN, S.; MATRAN, R.; PELAYO, P. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? *Br. J. Sports Med.* 42:828–833, 2008.
- BENEKE, R.; HÜTLER, M.; LEITHÄUSER, R.M.. Maximal lactate-steady-state independent of performance. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 32(6):1135-1139, 2000.
- BOESCH, C.. Musculoskeletal Spectroscopy . *J. Magn. Reson. Imaging.* 25(2):321–338, 2007.
- BOOTH, F.W.; LAYE M.J.; SPANGENBURG E.E. Gold standards for scientists who are conducting animal-based exercise studies. *J. Appl. Physiol.* 108(1):219-21, 2010.

COPP, S.W.; DAVIS, R.T.; POOLE, D.C.; MUSCH, T.I. Reproducibility of endurance capacity and VO₂peak in male Sprague-Dawley rats. *J. Appl. Physiol.* 106:1072-1078, 2009.

COYLE, E.F.; COGGAN, A.R.; HEMMERT, M.K.; IVY, J.L. Muscle glycogen utilization during prolonged strenuous exercise when fed carbohydrate. *J. Appl. Physiol.* 61(1):165-72, 1986.

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; JAIR RODRIGUES, G.; PITHON-CURI, T.C.; LANCHI JR, A.H.; PELLEGRINOTTI, I.L.; PROCOPIO, J. The Krebs Cycle as Limiting Factor for Fatty Acids Utilization During Aerobic Exercise. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 47(2):135-143, 2003.

de ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 148:888 - 892, 2007.

DE ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO-GOBATTO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Standardization of an experimental periodized training protocol in swimming rats. *Braz. J. Sports Med.* 16(1):51-56, 2010.

de ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; REIS, I.G.M.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 17 jun, Epub, ahead of print, 2011. PMID: 21681481.

DOTAN, R.; ZIGEL, L.; ROTSTEIN, A.; GREENBERG, T.; BENYAMINI, Y.; FALK, B. Reliability and validity of the lactate-minimum test. A revisit. *J. Sports. Med. Phys. Fitness.* 51(1):42-9, 2011.

DUBOIS, M.L.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350–356, 1956.

ENGEL, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. *Anal. Biochem.* 88(2):475-484, 1978.

FEBBRAIO, M.; DANCEY, J. Skeletal muscle energy metabolism during prolonged, fatiguing exercise. *J. Appl. Physiol.* 87(6):2341-2347, 1999.

FONTANA, P.; BOUTELLIER, U.; KNÖPFLI-LENZIN, C. Time to exhaustion at maximal lactate steady state is similar for cycling and running in moderately trained subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 107:187–192, 2009.

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. A: Mol. Integr. Physiol.* 130:21–27, 2001.

GREEN, H.J. How important is endogenous muscle glycogen in fatigue in prolonged exercise? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69(2):290–297, 1991.

IKEDA, M.; SAGARAB, M.; INOUÉ, S. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 279:185-189, 2000.

JACOBS, G.H.; FENWICK, J.A.; WILLIAMS, G.A. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J. Exp. Biol.* 204(pt 14):2439–2446, 2011.

KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. *Med. Sci.Sports Exerc.* 30(7):1137-9, 1998.

LAMBERT, E.V.; ST CLAIR GIBSON, A.; NOAKES, T.D. Complex systems model of fatigue: integrative homeostatic control of peripheral physiological systems during exercise in humans. *Br. J. Sports. Med.* 39:52–62, 2005.

LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Effects of chronic physical exercise on protein levels in diaphragm from diabetic rats. *Motriz.* 5(2):146-151, 1999.

MACINTOSH, B.R.; SHAHI, M.R.S. A peripheral governor regulates muscle contraction. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 36:1-11, 2011.

MANCHADO, F.B.; GOBATO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. *J. Exerc. Physiol.-Online* 8:29–35, 2005.

MCARDLE, W.D.; MONTROYE, H.J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J. Appl. Physiol.* 21(4):1431-1434, 1966.

NIELSEN, O.B.; DE PAOLI, F.; OVERGAARD, K. Protective effects of lactic acid on force production in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 536(pt 1):161–166, 2001.

OLIVEIRA, C.A.; PAIVA, M.F.; MOTA, C.A.; RIBEIRO, C.; LEME, J.A.; LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Exercise at anaerobic threshold intensity and insulin secretion by isolated pancreatic islets of rats. *Islets.* 2(4):240-246, 2010.

PETER, J.B.; BARNARD, R.J.; EDGERTON, V.R.; GILLESPIE, C.A.; STEMPEL, K.E. Metabolic profiles on three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry.* 11(14):2627-2733, 1972.

PETERSON, D.F., ARMSTRONG, R.B.; LAUGHLIN, M.H. Sympathetic neural influences on muscle blood flow in rats during submaximal exercise. *J. Appl. Physiol.* 65(1): 434-440, 1988.

PITTENDRIGH, C.S.; DAAN, S.A. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291–331, 1976.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. Exercise physiology: theory and application to fitness and performance. 2nd. Madison, Wis.: Brown & Benchmark Publishers. 48p. ISBN: 0697126579, 1994.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Currents concepts about physical exercise, fatigue and nutrition. *Braz. J. Phys. Education Sport.* 13(1):67-82, 1999.

SHEPARD, R.J.. It's time to retire the 'Central Governor'? Sports Med. 39(9):709-721, 2009.

SUN, J.H.; YAGA, K.; REITER, R.J.; GARZA, M.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; POEGGELER, B. Reduction in pineal N-acetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels in rats after their exposure to red light at night. Neurosci. Lett. 149(1):56-58, 1993.

TANAKA, H.; YANASE, M.; KANOSUE, K.; NAKAYAMA, T. Circadian variation of thermoregulatory responses during exercise in rats. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 258:836-841, 1990.

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. 35(11):1389-1394, 2002.

WEGENER, G; KRAUSE, U; NEWSHOLME, EA. Metabolic regulation – physiological and medical aspects. Experientia.52(5):391-395, 1996.

10.3. TIME TO EXHAUSTION AT LACTATE MINIMUM INTENSITY IS GREATER IN THE DARK PERIOD IN SWIMMING RATS

ABSTRACT

Forced swimming in rats has been widely used in sports and medicine sciences. These animals possess nocturnal habits and important parameters influenced by exercise showing circadian rhythms. Nevertheless, this chronobiological characteristic does not have been considered by many investigations. This experiment examine the time of day effect on the lactate minimum test (LMT) assessment and time to exhaustion at lactate minimum intensity (TTE_{LMI}) in swimming rats. Animals were handled and assessed at 12:00 h or 20:00 h, performing LMT and TTE_{LMI} at group's hour. LMT determination success rate and TTE_{LMI} were greater in the dark period.

Keywords: forced swimming, rats, exhaustion, aerobic capacity, time of day.

INTRODUCTION

The animal model has been used for many years in exercise science (McArdle & MONTROYE, 1966) by presenting several advantages, as the control of nutrition, environment and meteorological variables, beyond providing the possibility of invasive procedures impracticable in humans (e.g. some tissues extraction). Although rat is the most used animal in exercise experiments, they possess nocturnal habits, making some characteristics different from human model and important considerations for chronobiology and circadian rhythm investigation. For instance, it is well known that rats' body temperature is elevated between zeitgeber time (ZT) 14 and ZT 22 (TANAKA et al., 1990), with ~ 74 % of their total activity occurring at the dark period (IKEDA et al., 2000) and 62 % of total sleep time taking place at the light period (VAN LUIJTELAAR & COENEN, 1983), mainly between ZT 6 and ZT 9 (KLEINLOGEL, 1983).

The optimum time of day to conduct a training program can be determined referring to the athlete about the hour that he feels better to perform or analyzing the training responses in different ZT (ATKINSON & REILLY, 1996). Despite these considerations, it is noteworthy that the methodologies of many experiments do not pay attention to time of day and apply exercise and other routines at sleep period of the rat. Rats with sleep period altered (sleep deprivation) can suffer modulations in

body temperature and energy expenditures (EVERSON et al., 1989; EVERSON, 1995), growth hormone (SPATH-SCWALBE et al., 1995), corticosterone (LEPROULT et al., 1997) and oxidative stress (OLIVEIRA et al., 2002). Analyzing these points, other question arises: Rats chronically handled at their sleep period may have influence the exercise performance?

Following the trend of many biochemical variables, performance seems to be influenced by circadian variations in humans (ATKINSON & REILLY, 1996; DRUST et al., 2005; REILLY & WATERHOUSE, 2009). Studying long distances performances, some researchers found better results at afternoon and evening when compared whit morning (ATKINSON et al., 1994), and the body temperatures seems to play important role in this variations (REILLY & BROOKS 1982).

In this context, it is plausible to consider that the circadian rhythm is capable to influence the rats' performance and there is a lack of information on the literature about this important issue. Time to exhaustion exercise have been used to check the performance at maximum aerobic intensity in humans (FONTANA et al. 2009; BARON et al. 2008), however, even with the possibility to determine this intensity in rats we do not have this information.

Therewith, knowing the time of day effect in many variables, this experiment tests the chronic handling at a distinct circadian period and acute time of day effect on the LMT variables and time to exhaustion at lactate minimum intensity (TTE_{LMI}) in swimming rats. Beside this, we analyze the variation of muscular glycogen content under the same condition. The aim of this study was to identify if the LMT variables and TTE_{LMI} are influenced by time of day and if these tests are sensible to identify the ideal hour to performance in swimming rats.

METHODS

Animals

Eighty male Wistar rats (45 days old) obtained from the Central Bioterium of São Paulo State University were used in this study, which was approved by the institutional review board (protocol 018/2010). Animals were housed in 4 individuals per polypropylene cage and maintained under 12:12 h light-dark cycle with lights on at 06:00 h (ZT 0), and off at 18:00 h (ZT 12). During light phase the environment was illuminated by a 100 watts lamp (Phillips® soft white light, 2700 K, 565-590 nm) controlled by a potentiometer. The maximum intensity permitted inside the cage was

60 lux, measured by a lux meter (Instrutherm®, Sao Paulo, SP, Brazil, mod.THDL 400). During the experimental period rats received chlorinated water and rodents chow (70 % carbohydrate, 23.5 % protein, 6.5 % fat, Purina 5008, St. Louis, MO) *ad libitum*. Environmental relative humidity and temperature were kept at 45 - 55 % and 22 ± 2 °C, respectively, with noise below 85 decibels. The experiment was conducted according to current Brazilian legislation (Law nr 6638, 8th May 1979; Decree nr 24,645, 10th July 1934) and rigorously followed the standards of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and the Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols (AMERICAN PHYSIOLOGY SOCIETY, 2006) as well as ethical and methods principles postulated by Portaluppi et al. (2010).

Experimental design

Eighty rats were divided in two groups: animals handled at 12:00 h (G12, n = 40) and at 20:00 h (G20, n = 40). Except for the fact that replacement of water and food, cage cleaning, rats weighing and exercise testing were carried out at different time of day, all animals were kept under identical environmental conditions. Time schedules were adopted considering characteristic circadian variations of animal's body temperature (TANAKA et al., 1990) and spontaneous activity level (IKEDA et al., 2000). To routines that started at 20:00 h, special illumination was employed. The same lamp described was fixed to a reflector surrounded by a red filter (ROSCO®, Stamford, CT, USA, mod.#FIRE19), which blocks spectral energy below of 600 nanometers (nm). In this case, the light intensity permitted on the rat was 15 lux at maximum, once albino rats are very photo sensible (SUN et al., 1993; JACOBS et al., 2001). The lamps' position in the bioterium assured equal light intensity for all animals, whose were exposed to a red light only when necessary (for handling and swimming tests) and for the shortest time as possible. From 45 to 75 days old, animals were maintained on the previous described conditions to promote the environment adaptation. In the following two-week (13 d) period, they were also adapted to the aquatic environment, thermal stress and swimming exercise in order to avoid discontinuous swimming behavior. Twenty-four h after the last adaptation session, all rats were subjected to a lactate minimum test (LMT – DE ARAUJO et al, 2007), and 20 rats from each group performed an exhaustive swimming bout at lactate minimum intensity 48 h later. All procedures were carried out by only two

experienced researchers in order to minimize animal's stress due to manipulation and was respected the time of day of each specific group (12:00 h or 20:00 h).

Swimming tests

Swimming exercise bouts were conducted in individual tanks with 30 cm diameter and 120 cm deep, containing clean water at 31 ± 1 °C. Originally suggested for humans (TEGTBUR et al., 1993) and latter adapted (VOLTARELLI et al., 2002) and refined (DE ARAUJO et al., 2007) for swimming rats, the LMT consists in: (a) brief bouts of high intensity exercise to induce hyperlactemia; (b) a recovery period to allow for the movement of lactate from the exercised muscles to the bloodstream; and (c) a graded exercise protocol, in which a lactate minimum point can be objectively detected from the resultant U-shaped blood lactate response. This lactate minimum point is considered to occur at the maximal exercise intensity in which a balance exists between lactate production and clearance, thus enabling the estimation of the aerobic-anaerobic transition (VOLTARELLI et al., 2002; DE ARAUJO et al., 2007). Firstly, double swim bouts supporting a 13 % body mass load separated by 30 s rest were used for hyperlactemia induction, the first one lasting 30 s and the second one performed until exhaustion. Then, following a nine min recovery, an incremental testing phase comprising five min stages swimming supporting progressive loads (4, 4.5, 5, 5.5, 6 and 7 % body weight) and 30 s rest between stages was carried out to take twenty-five μ L blood samples from animal's tails at rest, at the seventh and ninth minutes after hyperlactemia induction and immediately after each stage during the incremental phase. Individual lactate minimum loads were determined by calculating the lowest value of a second order polynomial function fitting (blood lactate at y axis to swimming load at x axis). Lactate minimum intensity (LMi), lactate minimum concentration (LLM) and LMi determination success rate (%S) were obtained. The %S was accepted for animals that complete at least 3 incremental loads, elicited the "a" positive for polynomial function and the coefficient of determination was greater than .80.

Forty-eight hours after LMT, 20 rats per group were submitted to an exhaustive trial at the lactate minimum intensity, from which individual time to exhaustion (TTE_{LMi}) was taken to the nearest second considering the start of exercise until the moment at which all coordinated movements ceased and the

animal could no longer return to the surface (MCARDLE & MONTROYE, 1966). Exhaustion was accepted by the agreement of two experienced observers considering the above criteria and confirmed by the attenuation of the animal's righting reflex as suggested by Copp et al. (2010). Rats that consistently demonstrate discontinuous swimming behavior even after the adaptation period (*"introducing intermittent bouts of hypoxia"*) were removed from TTE_{LMi} data, following the recommendations of "Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols" (AMERICAN PHYSIOLOGY SOCIETY, 2006). The euthanasia occurred immediately after this effort for exercised animals at 12:00 h or 20:00 h (E12 and E20 – animals that performed TTE_{LMi}) and at the same hour in rest for control animals (C12 and C20 – animals that do not performed TTE_{LMi}, used as control for glycogen concentration), in carbonic gas chamber.

Collection of biological material and biochemical analysis

For blood lactate determination, 25 μ L samples were collected from the animal's distal tail at specific moments during LMT as well as immediately before (resting) and after TTE_{LMi}, using heparinized capillary tubes. Samples were instantly transferred to plastic tubes (1.5 mL) containing 400 μ L of trichloroacetic acid (TCA – 4 %) and analyzed by enzymatic method at 340 nm against the calibration curve (ENGEL & JONES, 1978). Gluteus maximus samples were instantaneously extracted, prepared and analyzed on the spectrophotometer at 490 nm, employing the colorimetric method to determine glycogen concentration, described elsewhere (DUBOIS et al., 1956).

Statistical analysis

All data were described as mean $\pm$ standard deviation (SD). Normal Gaussian distribution was analyzed by Kolmogorov-Smirnov test. TTE_{LMi} and muscular glycogen data were transformed using the 1/x approach before parametric analysis. Unpaired t test was used for comparisons between G12 and G20 for LMT variables and regarding TTE_{LMi} for E12 and E20. The effect size (ES) was calculated for LMT variables and TTE_{LMi} between times of day [$ES = (\text{mean1} - \text{mean2}) / \text{averaged standard deviation}$] (COHEN, 1988). Two way analysis of variance was employed to check the main effects (time of day and exercise) and their interaction for skeletal muscle glycogen content (C12, E12, C20 and E20 groups) using the general linear

model (GLM) module of Statistica 7.0 Package (Statsoft, Tulsa, USA), being unequal n Tukey post hoc test used for pairwise comparisons, when pertinent. For relationship analysis Pearson product-moment correlation coefficients were used. All routines were processed at significance level of 5 % ($p < 0.05$).

RESULTS

Lactate minimum was successfully determined in 65 % ($n = 26$) of animals evaluated at 12:00 h and 85 % ($n = 34$) of those evaluated at 20:00 h. T test showed no significant differences between these groups for LMi ($4.95 \pm .40$ vs $4.83 \pm .48$ % bw; $p = .31$; ES = -.27) and LLM (7.32 ± 1.79 vs 6.60 ± 1.97 mM; $p = .15$; ES = -.38). According to the exclusion criteria from the American Physiology Society (2006), 14 rats from E12 and 16 rats from E20 successfully performed the exhaustive exercise bout at LMi. TTE_{LMi} was 39.7 % greater in E20 compared to E12 and these results are shown in table 1. No significant relationships were found between LMi and TTE_{LMi} in E12 ($r = -0.10$; $p = 0.70$) or E20 ($r = 0.49$; $p = 0.70$).

Table 1. Lactate minimum intensity (LMi), lactate concentration of lactate minimum test (LLM), time to exhaustion at LMi (TTE_{LMi}) and lactatemia before (LAC_{rest}) and after ($LAC_{post\ eff}$) TTE_{LMi} presented with p-value and effect size (ES).

Variables	12:00 h	20:00 h	p-value	ES
LMi (% bw)	$4.95 \pm .40$	$4.83 \pm .48$	0.31	-0.27
LLM (mM)	7.32 ± 1.79	6.60 ± 1.97	0.15	-0.38
TTE_{LMi} (min)	77.96 ± 30.81	108.89 ± 46.33 *	0.03	0.80
LAC_{rest} (mM)	1.69 ± 0.24	1.81 ± 0.31	0.23	0.41
$LAC_{post\ eff}$ (mM)	7.29 ± 1.47	7.35 ± 1.89	0.91	0.04

* $p < 0.05$ in relation to 12:00 h.

Skeletal muscle glycogen contents are shown in Figure 1. ANOVA revealed significant main effects for time of day ($F_{1,62} = 10.21$, $p < 0.01$; 20:00 > 12:00 h) and exercise ($F_{1,62} = 29.95$, $p < 0.01$; control > exercised groups) as well as a significant time of day - exercise interaction for this variable ($F_{1,62} = 4.75$, $p = 0.03$). Post hoc analysis showed skeletal muscle glycogen in C20 to be significantly greater than those in C12 ($p < 0.01$), E12 ($p < 0.01$) and E20 ($p < 0.01$) other groups, which in

turn did not differ significantly from other ($p > 0.05$). The percentage depletion of glycogen (%DG) was calculated between CG and EG for each specific time of day (12:00 h and 20:00 h). Were found 60.82 % and 70.95% for 12:00 h and 20:00 h, respectively.

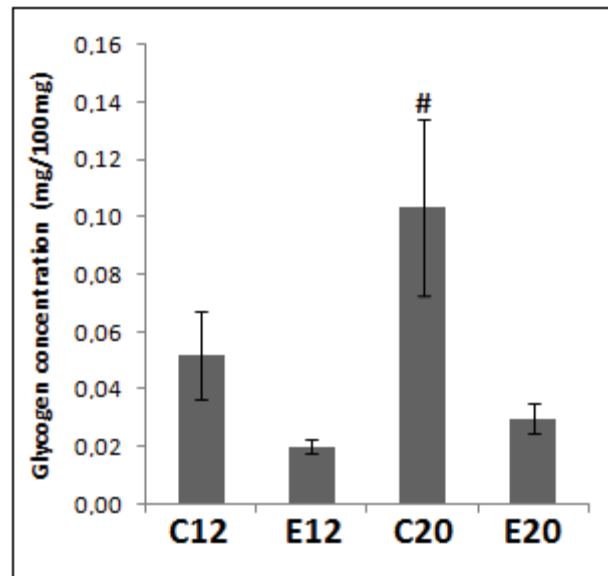


Figure 1. Muscular glycogen concentration for control (C12 and C20) and exercised (E12 and E20) groups handled at 12:00 h and 20:00 h, respectively; # $p < 0.05$ from C12, E12 and E20.

DISCUSSION

The main finding of this investigation was that TTE_{LMI} was greater in dark vs light period in swimming rats. To our knowledge this is the first study addressing the time of day effect on the time to exhaustion at an individualized intensity in rodents, and these results suggest that as in humans (FORSYTH & REILLY, 2004; ATKINSON et al., 2006), exercise performance seems to show a circadian rhythm in such animals.

Despite the time of day effect on TTE_{LMI} we found no significant differences between E12 vs E20 rats regarding lactate minimum intensities, both groups showing values close to those reported in prior studies (approximately 5%bw, VOLTARELLI et al. 2002; DE ARAUJO et al. 2007; DE ARAUJO et al. 2011). In addition, we found no significant relationships between TTE_{LMI} and LMI , suggesting that lactate minimum

intensity and time to exhaustion are independent entities that are differentially affected by the circadian rhythm. Interestingly, LMT determination success rate was 20% greater at 20:00 h in relation to 12:00 h, suggesting the dark period as ideal moment to lactate minimum assessment in swimming by using fewer animals to attainment of wished number of rats per group.

In humans, there is evidence that both anaerobic (BESSOT et al., 2005; SOUISSI et al., 2010) and aerobic (ATKINSON & REILLY, 1995; FORSYTH & REILLY, 2004) exercise performances are improved in the afternoon compared to the morning, which is at least partially explained by the greater core temperature in the former period (ATKINSON & REILLY, 1995; FORSYTH & REILLY, 2004). On the other hand, Hessemer et al. (1984) postulated that a low body temperature could be an advantage to prolonged exercise, whereas Dalton et al. (1997) argues that high body temperatures increase lactate production during exercise through increased phosphofructokinase and lactate dehydrogenase activities. Nevertheless, our results suggest that in rats, exercise performance is improved in the higher body temperature period (i.e., the dark period) according to Tanaka et al. (1990) zeitgeber time determination. Waterhouse et al. (2007) affirmed that exercises performed at the same intensity can produce different thermoregulatory responses depending time of day.

To assure reliable results, some cares are important on the methodologies of animal model exercise. Drust et al. (2005) discourses about the usefulness of assess real competitions and Atkinson & Nevill (2001) emphasized the importance of the performance test selection in human model because the possible influence of individual motivation. On the forced swimming model, the rat is submitted to a life-threatening situation, making this ergometer a competitions' simulator, avoiding this influence. Other care was take, in order to avoid the effect of serial fatigue (DRUST et al., 2005), exercise performed the day before (EDWARDS et al., 2005), or any phase shift caused by LMT, once the TTE_{LMT} was applied respecting an interval of 48 h. Unfortunately however, the time of day effect on exercise performance in rats has been neglected in the specific scientific literature. In behavior studies the use of adequate hour of the procedures application could reduce the stress response (PITTENDRIGH & DAAN, 1976) and it is known that 20:00 h is characterized by the wakefulness period of the rat (IKEDA et al., 2000) making these parameters some

answers for high %S and TTE_{LMI} at this time. Certainly, other investigations are necessary to identify all the reasons of high %S and TTE_{LMI} at dark period, however, some additional motives can be displayed. We can speculate that the chronic condition of sleep disruption probably caused by manipulation on the G12, and E12, could be a contributor agent for our results, since observed information cited on the introduction of this document. Yet, the peak of food intake in male adult rats occurs at the onset of darkness (HAAR, 1972), conducting us to the interpretation that E12 animals had fasted for many hours while E20 had feed before TTE_{LMI} . Carbohydrate is the major substrate for the intensity of exercise used (BENEKE et al., 2000) and muscular glycogen content at 20:00 h was greater (E20) before exercise when compared to 12:00h (E12). This condition seems to be determinant to high TTE_{LMI} found in our study and reinforce the affirmation that LMT is not affected by nutritional status (TEGTBUR et al., 1993), either in rats, showing the robustness of the protocol.

One limitation of our study is that the animals are sedentary, nevertheless, training programs for swimming rats are recently emerging on the literature (DE ARAUJO et al., 2011) and need more discussion to the real attainment of trained rats. Other point is that we do not verify the body temperature or activity level in several times during a day (although the use of these variables along the text as justification), however, these data are very well established on the literature and Wistar rats seems to show the same behavior when environmental conditions are carefully maintained.

CONCLUSION

The findings of our study support that lactate minimum intensity and time to exhaustion at this intensity are independent entities and are affected by the circadian rhythm differently. LMT do not suffer variations caused by time of day, however, the %S and TTE_{LMI} were greater at dark period, showing the ideal moment to aerobic assessment in swimming for rats. Future studies are necessary to identify the time of day acute effect variation on these parameters to entirely understand these phenomena.

REFERENCES

AMERICAN PHYSIOLOGY SOCIETY. Resource book for the design of animal exercise protocols, 2006.

ATKINSON, G.; COLDWELLS, A.; REILLY, T.; WATERHOUSE, J. The influence of age on diurnal variations in competitive cycling performances. *J. Sports Sci.* 12: 127-128, 1994.

ATKINSON, G.; DRUST, G.; GEORGE, K.; REILLY, T.; WATERHOUSE, J. Chronobiological Considerations for Exercise and Heart Disease. *Sports Med.* 36:487-500, 2006.

ATKINSON, G.; NEVIL, A.M. Selected issues in the design and Analysis of Sport performance research. *J. sports Sci.* 19:811-827, 2001.

ATKINSON, G.; REILLY, T. Effects of age and time of Day on preferred work rates during prolonged exercise. *Chronobiol. Int.* 12:121-134, 1995

ATKINSON, G.; REILLY, T. Circadian variation in sports performance. *Sports Med.* 21:292-312, 1996.

BARON, B.; NOAKES, T.D.; DEKERLE, J.; MOULLAN, F.; ROBIN, S.; MATRAN, R.; PELAYO, P. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? *Br. J. Sports Med.* 42:828–833, 2008.

BENEKE, R.; HÜTLER, M.; LEITHÄUSER, R.M.. Maximal lactate-steady-state independent of performance. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 32(6):1135-1139, 2000.

BESSOT, N.; NICOLAS, A.; MOUSSAY, S.; GAUTHIER, A.; SESBOU, B.; DAVENNE, D. The effect of pedal rate and time of Day on the time to exhaustion from high-intensity exercise. *Chronobiol. Int.* 23:1009–1024, 2006

COHEN, J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

COOP, S.W.; HIRAI, D.M.; MUSCH, T.I.; POOLE, D.C. Critical speed in the rat: implications for hindlimb muscle blood flow distribution and fibre recruitment. *J. Physiol.* 588.24:5077–5087, 2010.

DALTON, B.; MCNAUGHTON, L.; DAVOREN, B. Circadian rhythms have no effect on cycling performance. *Int. J. Sports Med.* 18:538–542, 1997.

de ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integ. Physiol.* 148:888 - 892, 2007.

de ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; REIS, I.G.M.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 17 jun, Epub, ahead of print, 2011. PMID: 21681481.

DRUST, B.; WATERHOUSE, J.; ATKINSON, G.; EDWARDS, B.; REILLY, T. Circadian rhythms in sports performance – an update. *Chronobiol. Int.* 22:21-44, 2005.

DUBOIS, M.L.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350–356, 1956.

ENGEL, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. *Anal. Biochem.* 88(2):475-484, 1978.

EVERSON, C.; BERGMANN, B.M.; RECHTSCHAFFEN, A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep.* 12:12-21, 1989.

EVERSON, C. Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav. Brain Res.* 69:43-54, 1995.

FONTANA, P.; BOUTELLIER, U.; KNÖPFLI-LENZIN, C. Time to exhaustion at maximal lactate steady state is similar for cycling and running in moderately trained subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 107:187–192, 2009.

FORSYTH, J.J.; REILLY, T. Circadian rhythms in blood lactate concentration during incremental ergometer rowing. *Eur. J. appl. Physiol.* 92:69-74, 2004.

HAAR, T. Circadian and estrual rhythms in food intake in the rat. *Hormones and behavior.* 3(3):213-219, 1972.

HESSEMER, V.; LANGUSCH, D.; BRÜCK, L.K.; BÖDEKER, R.H.; BREIDENBACH, T. Effects of slightly lowered body temperatures on endurance performance in humans. *J. Appl. Physiol.* 57:1731-1737, 1984.

IKEDA, M.; SAGARAB, M.; INOUÉ, S. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 279:185-189, 2000.

JACOBS, G.H.; FENWICK J.A.; WILLIAMS, G.A. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J. Exp. Biol.* 204:2439–2446, 2001.

KLEINLOGEL, H. Sleep in various species of laboratory animals. *Neuropsychobiology* 9:174-177, 1983.

LEPROULT, R.; COMPINSCHI, G.; BUXTON, O.; VAN CAUTER, E. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep.* 20:865-870, 1997.

MCARDLE, W.D.; MONTROYE, H.J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J. Appl. Physiol.* 21(4):1431-1434, 1966.

OLIVEIRA, A.C.; D'ALMEIDA, V.; HIPÓLIDE, D.C.; NOBREGA, J.N.; TUFIK, S. Sleep deprivation reduces total plasma homocysteine levels in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80:193-197, 2002.

PITTENDRIGH, C.S.; DAAN, S.A. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291–331, 1976.

PORTALUPPI, F.; SMOLENSKY, M.H.; TOUITOU, Y. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol. Int.* 27:1911–1929, 2010.

REILLY, T.; BROOKS, G.A. Investigation of circadian rhythms in metabolic responses to exercise. *Ergonomics* 25:1093–1107, 1982.

REILLY, T.; WATERHOUSE, J. Sports performance: is there evidence that the body clock plays a role? *Eur. J. Appl. Physiol.* 106:321–332, 2009.

SOUISSI, N.; DRISS, T.; CHAMARI, K.; VANDEWALLE, H.; DAVENNE, D.; GAM, A.; FILLARD, J.R.; JOUSSELIN, E. Diurnal variation in wingate test performances: influence of active warm-up. *Chronobiol. Int.* 27:640–652, 2010.

SPATCH-SCHWALBE, E.; HUNDENBORN, C.; KERN, W.; FEHM, H.; BORN, J. Nocturnal wakefulness inhibits growth hormone (GH)- releasing hormone-induced GH secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:214-219, 1995.

SUN, J.H.; YAGA, K.; REITER, R.J.; GARZA, M.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; PÖEGGELER, B. Reduction in pineal N-acetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels in rats after their exposure to red light at night. *Neurosci Lett.* 149(1):56-8, 1993.

TANAKA, H.; YANASE, M.; KANOSUE, K.; NAKAYAMA, T. Circadian variation of thermoregulatory responses during exercise in rats. *Am. J. Physiol. (Regul. Integr. Comp. Physiol.* 258):836-841, 1990.

TEGTBUR, U; BUSSE, MW; BRAUMANN, KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25:620-627, 1993.

VAN LUIJTELAAR, E.L.J.M.; COENEN, A.M.L. An EEG averaging technique for automated sleep-wake stage identification in the rat. *Physiology & Behavior.* 33:837-841, 1983.

VOLTARELLI, F.A.; GOBETTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Medical Biological Res.* 35, 1–6, 2002.

WATERHOUSE, J.; AIZAWA, S.; NEVILL, A.; EDWARDS, B.; WEINERT, D.; ATKINSON, G.; REILLY, T. Rectal temperature, distal sweat rate, and forearm blood flow following mild exercise at two phases of the circadian cycle. *Chronobiol. Int.* 24: 63–85, 2007.

10.4. HANDLING AND EXERCISE AT LACTATE MINIMUM INTENSITY PERFORMED UNTIL EXHAUSTION ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS: TIME OF DAY EFFECT

ABSTRACT

The animal model has been used many years ago, and exercise is one intervention widely applied. However, the rat possesses nocturnal habits, making some chronobiological characteristics different from human. The aim of this investigation was to verify the hematological responses after chronic handling and acute exercise performed at two different times of day (12:00 h and 20:00 h) in swimming rats. Were used 80 Wistar rats, divided in four groups, being two control (12:00 h and 20:00 h) and two experimental groups (12:00 h and 20:00 h). After all rats performed the lactate minimum test (TLM), the experimental groups were submitted to an exercise until exhaustion at this intensity, respecting 48 h of interval. Special illumination was used for 20:00 h tests. After this procedure the animals were euthanized (at the same hour for control groups, at rest) and were collected blood samples for hematological analysis. The principal find was the great time of day and exercise effects on white blood cells (WBC) count and less influence on red blood cells count. This chronobiological effect on WBC is very important to direct future studies involving animal model, once time of day handling was significant and these parameters are used as immunological status.

Keywords: Rat. Exercise. Chronobiology. Hematological parameters.

INTRODUCTION

The animal model has been used for researchers to the improvement of knowledge of many diseases, as cancer, diabetes mellitus, hyperthyroidism, lipid abnormally and many others. The exercise in experimental designs has been applied since 1960 decade (MCARDLE & MONTOYE, 1966) and combines several advantages, being an excellent way to study physiological, cardiovascular, pulmonary and metabolic mechanisms modulated by physical exercise (COOP et al., 2009). Nevertheless, the objective and individual control of exercise intensity in rats only won researchers' attention in the last years, and our laboratory has contributed to the advancement of this study field (GOBATTO et al., 2001; VOLTARELLI et al.,

2002; MANCHADO et al., 2005; DE ARAUJO et al., 2007; De ARAUJO et al., 2011). With the standardization of lactate minimum test (LMT) for rats (VOLTARELLI et al., 2002; DE ARAUJO et al., 2007), the aerobic capacity intensity in these animals can be identified, allowing high control of individual intensity prescription.

In human model studies, the time to exhaustion exercise has been used to check the performance at maximum aerobic intensity (FONTANA et al., 2009; BARON et al., 2008). Despite this, there is a lack of information which comes from this procedure in rats, making necessary the identification of this specific volume and intensity of exercise on some physiological parameters. Despite hematological analysis has been used since first years of 19th century, it remains important and widely applied actually in sports medicine area, which use this kind of test for clinical and anti doping purposes (LIPPI et al., 2010) or to identify health status (BANFI et al., 2004) through a simple and rapid procedure. Red blood cells (RBC) have been studied on the field of exercise once it is responsible to important functions, like facilitating the oxygen availability to the active tissues (KENNEDY et al., 2005) and helping on the acid base equilibrium (GUYTON & HALL, 2006). Beside this, the RBC count stability can be used as health status indicator before and after extreme aerobic performance (BANFI et al., 2004). Inflammation and immunological studies are a growing area in sports science and the white blood cells (WBC) count, considering all different types of leucocytes, have been used as immune and inflammatory parameters (NIEMAN, 1994). However, a hematological result seems to be influenced by some variables, as circadian variations (SMAALAND et al., 2002) or exercise (SCHUMACHER et al., 2002) in humans, and the rat possesses nocturnal habits and different chronobiological variations from humans in some parameters. The concern is that these important conditions have not been considered in several studies.

Even with the possibility of strict control of intensity for swimming rats, surprisingly, it is unknown the aerobic exercise at lactate minimum intensity performed until exhaustion and time of day effects on hematological parameters. The objective of this study was to verify these responses.

METHODS

Animals

Eighty male Wistar rats (90 days old) were maintained under 12:12 h light-dark cycle with lights on at 06:00 h and off at 18:00 h. Rodents were housed in polyethylene cages (4 per cage) with chlorinated water and rodents chow (70% carbohydrate, 23.5% protein, 6.5% fat, Purina, St. Louis, MO) *ad libitum*. Relative humidity was kept at 45-55% in the environment, with temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ and noise below 85 decibels. The experiment was conducted according to current Brazilian legislation (Law nr 6638, May 8, 1979; Decree nr 24,645, July 10, 1934). Standards of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) were rigorously followed, even as the *Resource book for the design of animal exercise protocols* (AMERICAN PHYSIOLOGY SOCIETY, 2006) and Portaluppi et al. (2010) recommendations. The project was approved by Ethics Committee on the Use of Animals (Bioscience Institute of São Paulo State University) under protocol number 018/2010 before begin.

Experimental design

Animals were housed on the conditions described above with 45 days old to promote the environment adaptation (EA). Two weeks before completing 90 days old all animals were adapted to aquatic environment, thermal stress, swimming at deep water (progressively 15-50-120cm) and handling for all routines, until 90 days old (called specific adaptation - SA). These procedures were realized by only 2 researchers in order to assure that experiment results do not possess influence of any additional stress.

At 45 days old rats were divided in four groups of 20 animals: two handled at 12:00 h (control-C12; experimental-E12) and two at 20:00 h (control-C20; experimental-E20), kept in different rooms with equal environment conditions. This time of day difference was called hour effect (time of day), and exercise was considered another main effect. Replacement of water and food, cage cleaning and rats weighing were carried out by a regular time schedule, according to group. This time of day was choice observing the maximum and minimum body temperature and level of activity of rats respecting zeitgeber time, investigated elsewhere (TANAKA et al., 1990; IKEDA et al., 2000).

At 90 days old all animals performed the lactate minimum test (LMT) according to De Araújo et al. (2007), using the protocol number four of these authors to hyperlactatemia induction. After 48 hs of LMT, experimental groups (E12 and E20) were submitted to time to exhaustion exercise at lactate minimum intensity (TTE_{LMI}) and euthanized immediately after this effort (or at rest at same hour for C12 and C20). The exhaustion was defined when the rat can no longer sustain the exercise (task failure), remaining submerged at least 15 seconds even with vigorous attempts to emerge (MCARDLE & MONTROYE, 1966). All swimming routines occurred in individual tank with 30cm diameter and 120cm deep, containing clean water at $31\pm1^{\circ}\text{C}$.

Illumination

During light phase (06:00 h to 18:00 h) the environment were illuminated by 100W lamp (Phillips® soft white light, 2700 K, 565-590 nm) controlled by a potentiometer. The maximum intensity permitted inside the cage was 60 lux, measured by a lux meter (Instrutherm®, mod.THDL 400). At 18:00 h to 06:00 h light was turned off. An investigation showed that light, even red, can promote modifications in pineal N-acetyltransferase activity in rats (SUN et al., 1993). These researchers found less influence of light when low irradiance with red light was used. So, considering that rats are very photo sensible (JACOBS et al., 2001), to routines that started at 20:00 h a special illumination was employed. The same lamp described was fixed to a reflector surrounded by a red filter (ROSCO®, mod.#FIRE19), which blocks spectral energy below of 600 nanometers. Light intensity permitted on the rat was 15 lux at maximum. The position of the bioterium' lamps assured equal light intensity for all animals, whose were exposed to a red light only when necessary (for handling and swimming tests) and for the shortest time as possible.

Collection of biological material and biochemical analysis

To the lactate determination, 25 μL of blood was collected when necessary (LMT) from the distal tail using heparinized capillary tubes. Samples were instantly transferred to plastic tubes (1.5 mL) containing 400 μL of trichloroacetic acid (TCA - 4 %). After sample preparation, lactate concentration was determined at 340 nm against the calibration curve (ENGEL & JONES, 1978).

Animals were euthanized in carbonic gas chamber and after this procedure blood sample was collected by cardiac puncture and dispensed in polyethylene tubes containing anticoagulant K₃EDTA (FL Medical, Torreglia, PD, Italy) for hematological analysis, immediately after collected. No evidence of hemolysis was observed using these tubes. Hematological parameters (RBC, Red Blood Count [Erythrocytes]; Hb, Hemoglobin; Hct, Hematocrit; MCV, Mean Corpuscular Volume; MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; RDW, Red Cell Distribution Width; WBC, White Blood Count [Leucocytes]; Lymp, Lymphocytes; Mono, Monocytes; Neutr, Neutrophils) were analyzed by hemocytometric tests performed on MAXM Coulter. The equipment was checked before the analyses, which were realized in a commercial laboratory assured by a national program of quality control since 1997. Blood volume, red cell volume and plasma volume changes were calculated according Dill & Costill (1974), using the mean values of Hb and Hct for C12 versus E12 and C20 versus E20 (independent samples).

Statistical analysis

All data were described in mean $\pm$ standard deviation (SD). Normal Gaussian distribution and equality of variances were analyzed by kolmogorov-Smirnov test and levene's test, respectively, for all dependent variables. T test for independent samples was used to analyze the difference between E12 and E20 for TTE_{LMI}. Analysis of variance (Anova) two way were employed to check the main effects and exercise x time of day interactions on the parametric tests for others dependent variables. When significant effect was found on Anova, Newmann Keuls post hoc test was used to set the differences. All routines were processed at significance level of 5% ($p < 0.05$), using Statistica 7.0 Package (Statsoft, Tulsa, USA).

RESULTS

The lactate minimum intensity for all animals that obtain success on the test was $4.83 \pm 0.45\%$ of body weight and lactatemia 6.92 ± 1.91 mmol/L. The time to exhaustion at lactate minimum intensity for the animals that showed continuous swimming behavior was 1.30 ± 0.51 h for E12 and 1.81 ± 0.77 h for E20 ($p = 0.03$).

Considering all hematological variables and all main effects and interaction, RBC, MCV, MCH, MCHC and RDW showed no statistic significance (table 1). On the red blood cells, exercise effect was found for Hb (exercised > control), however, post hoc test showed no differences between groups. Was found exercise effect for Hct (exercised > control), being C12 < E12 ($p=0.045$) and C12 < E20 ($p = 0.010$).

Time of day effect was found for all white blood cells variables (WBC, Limp, Mono and Neutr) and exercise effect was no found only for monocytes (table 1). No interactions were found for any hematological variable and in general, 12:00 h and exercised groups showed high WBC in relation to 20:00 h and control, respectively. Post hoc analysis described systematic differences between groups (C12 vs E12, C20 vs E20, C12 vs C20 and E12 vs E20, $p<0.05$ for all) for WBC and lymphocytes. Regarding these crosses, only C12 vs E12 for monocytes ($p=0.15$) and C12 vs C20 for neutrophils ($p=0.43$) showed no significant differences between groups.

Blood volume, red cell volume and plasma volume were -2.67%, 1.54% and -6.21% for 12:00 h, and -2.81%, -0.56% and -4.82% for 20:00 h, respectively.

DISCUSSION

The principal finds of this study were the significance of time of day and exercise effect for the most of WBC, showing systematically higher counts for 12:00 h and exercised groups in relation to 20:00 h and control groups, respectively. Beside these results, the exercise effect for Hb and Hct was significant, with higher counts for exercised groups, without time of day effect. This data awakens the capacity of time of day and exercise act on the hematological parameters of rats, which is used as health parameter of these laboratory animals.

The lactate minimum test (LMT) is used as an indicator of endurance exercise capacity and was adapted from human model by Voltarelli et al. (2002), which found intensity corresponding to 4.95 ± 0.10 % bw. Few years after, other study refine this procedure investigating different protocols for hiperlactatemia induction phase (DE ARAUJO et al., 2007).

Table 1. Hematological parameters for all groups expressed in mean $\pm$ standard deviation and Anova results.

	12:00 h		20:00 h		Hour effect		Exerc effect		Int	
	Control	Exerc	Control	Exerc	F _{1,65}	p	F _{1,65}	p	F _{1,65}	p
RBC (10 ¹² /l)	8.22 $\pm$ 0.53	8.39 $\pm$ 0.48	8.31 $\pm$ 0.42	8.55 $\pm$ 0.38	1.17	0.28	3.18	0.08	0.06	0.81
Hb (g/dl)	14.66 $\pm$ 0.69	15.06 $\pm$ 0.75	14.78 $\pm$ 0.65	15.21 $\pm$ 0.58	0.64	0.43	6.26	0.01 *	0.01	0.94
Hct (%)	45.66 $\pm$ 2.24	47.64 $\pm$ 2.40	47.10 $\pm$ 2.06	48.19 $\pm$ 2.10	3.43	0.07	8.12	<0.01 *	0.68	0.41
MCV (fL)	55.65 $\pm$ 2.19	56.81 $\pm$ 2.13	56.71 $\pm$ 2.61	56.45 $\pm$ 2.74	0.35	0.55	0.58	0.45	1.44	0.23
MCH (pg)	18.37 $\pm$ 2.23	17.88 $\pm$ 0.65	17.79 $\pm$ 0.59	17.82 $\pm$ 0.54	1.02	0.32	0.55	0.46	0.65	0.42
MCHC (g/dl)	32.12 $\pm$ 0.71	31.49 $\pm$ 0.52	31.41 $\pm$ 1.08	31.57 $\pm$ 0.86	2.47	0.12	1.35	0.25	3.78	0.06
RDW (%)	18.25 $\pm$ 1.17	18.31 $\pm$ 1.33	18.45 $\pm$ 0.91	18.87 $\pm$ 0.76	1.94	0.16	0.80	0.37	0.43	0.51
WBC (10 ⁹ /l)	10.33 $\pm$ 2.96	12.82 $\pm$ 3.09	6.85 $\pm$ 1.92	8.86 $\pm$ 2.69	32.30	<0.01 *	11.84	<0.01*	0.13	0.71
Limp (10 ⁹ /l)	6.75 $\pm$ 2.59	8.19 $\pm$ 2.57	4.35 $\pm$ 1.43	5.85 $\pm$ 2.01	22.19	<0.01 *	8.53	0.04 *	0.02	0.96
Mono (10 ⁹ /l)	0.69 $\pm$ 0.33	0.82 $\pm$ 0.30	0.30 $\pm$ 0.19	0.37 $\pm$ 0.20	43.13	<0.01 *	2.45	0.12	0.23	0.62
Neutr (10 ⁹ /l)	2.71 $\pm$ 0.94	4.27 $\pm$ 1.46	2.39 $\pm$ 0.89	3.57 $\pm$ 1.37	5.10	0.02 *	28.61	<0.01 *	1.31	0.25

RBC, Red Blood Count (Erythrocytes); Hb, Hemoglobin; Hct, Hematocrit; MCV, Mean Corpuscular Volume; MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; RDW, Red Cell Distribution Width; WBC, White Blood Count (Leucocytes); Lymph, Lymphocytes; Mono, Monocytes; Neutr, Neutrophils.

*p<0.05

Employing the protocol number four (suggested as the best), these authors reported 5.06 ± 0.93 % bw for lactate minimum intensity, and De Araujo et al. (2011) 4.93 ± 0.25 % bw, showing that our values are very close of those found in literature.

The performance test (TTE_{LMI}) was greater at 20:00 h in relation to 12:00 h, being significantly influenced by time of day. We associate this finds to high body core temperature and activity levels, which are naturally elevated at this zeitgeber time featuring their wakefulness period (TANAKA et al., 1990; IKEDA et al., 2000), probably generating less stress (PITTENDRIGH & DAAN, 1976) and better conditions to exercise performance, once at 12:00 h rats are on their sleep period.

Normal hematological values were found when comparing our data with the literature for Wistar rats (CARVALHO et al., 2009). The variation described on the table 1 seems to be normal once control and experimental groups with two different crossed effects were employed and hematological variables are influenced by several factors (PILNY, 2008). Observing the data of our study, Hct shown significant exercise effect, producing differences between groups ($C12 < E12$, $p = 0.04$; and $C12 < E20$, $p = 0.01$) and higher values for exercised animals, as expected after one bout of exercise. The same effect occurs to Hb, however, no differences were found between groups (post hoc analysis). The blood and plasma volume suffer decrease, as described at results session, however, the red cell volume do not show some standard of modulation. It is important to consider that these data were calculated from different groups of animals (independent samples) and once we applied long duration exercise without hydration, the liquid loss probably conduct to this result (POLAT, 2011). We believe that significant modification on the most RBC is due to a systematic training program and not to acute exercise. Beside this, only chronic handling not seems to be capable to influence these variables, as opposite to WBC.

It is well described that leucocytes increases immediately after exercise in humans (NIEMAN & NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994), normally associated to catecholamine increase (GABRIEL et al., 1992, SEELAENDER et al., 1999). However, differences on the WBC response are identified depending to exercise intensity (STRASNER et al., 1997), duration (GLESSON et al., 1990) and physical status (KENDALL et al., 1990), being prolonged exercises probably influenced by cortisol secretion too (PEDERSEN et al., 1997; NIEMAN & PEDERSEN, 1999). For rats the same behavior seems to occur, as found in our experiment, showing that this

volume and intensity of exercise allowed high increase on WBC immediately after exercise. Nieman (1994) postulated these conditions in humans, mainly due to the expense of lymphocytes, neutrophils and at less proportion caused by monocytes. Our study showed that in rats the hematological behavior seems to be similar.

Time of day was the other effect investigated and was very apparent for all WBC components, as described in table 1. The rat possesses nocturnal habits and the handling and assessment at 12:00 h occur at sleep period (IKEDA et al., 2000). Rats with altered sleep period (sleep deprivation) can suffer modulations in body temperature and energy expenditures (EVERSON et al., 1989; EVERSON, 1995), growth hormone (SPATH-SCWALBE et al., 1995), corticosterone (LEPROULT et al., 1997) and oxidative stress (OLIVEIRA et al., 2002). Considering that the handling were chronic (since 45 days old until euthanize) these motives can be some of the responsible for an increase of chronic stress (PITTENDRIGH & DAAN, 1976), leading to high and abnormal WBC counts at 12:00 h, classically associated to infections. If rats are manipulated at wrong time of day, investigations about some diseases could associate this as a main effect and simply disregard such extremely important condition.

CONCLUSION

The results showed great time of day and exercise effects on WBC count, which is widely used as immunological status information on basic physiology experiments and pathologic investigations, making an important methodological contribution for these researchers. We associate the RBC change as transient and due to plasma volume change, as classically discussed on the literature. More studies are necessary to entirely understand the time to exhaustion at lactate minimum intensity and time of day effects on the hematological parameters in rats, however, this study showed dramatic effects modulated by methodological parameters, not every attempted by researchers.

REFERENCES

BANFI, G.; ROI, G.S.; DOLCI, A.; SUSTA, D. Behaviour of haematological parameters in athletes performing marathons and ultramarathons in altitude ('skyrunners'). Clin. Lab. Haem. 26, 373–377, 2004.

BARON, B.; NOAKES, T.D.; DEKERLE, J.; MOULLAN, F.; ROBIN, S.; MATRAN, R.; PELAYO, P. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? *Br. J. Sports Med.* 42:828–833, 2008.

CARVALHO, G.D.; MASSENO, A.P.B.; ZANINI, M.S.; ZANINI, S.F.; PORFÍRIO, L.C.; MACHADO, J.P.; MAUAD, H. Clinical evaluation of laboratory rats (*Rattus norvegicus* Wistar Strain): sanitary, biological and physiological parameters. *Ceres Review*. 56(1): 051-057, 2009.

COOP, S.W.; HIRAI, D.M.; MUSCH, T.I.; POOLE, D.C. Critical speed in the rat: implications for hindlimb muscle blood flow distribution and fibre recruitment. *J. Physiol.* 588.24:5077–5087, 2010.

De ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; REIS, I.G.M.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 17 jun, Epub, ahead of print, 2011. PMID: 21681481.

De ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 148:888 - 892, 2007.

ENGEL, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. *Anal. Biochem.* 88(2):475-484, 1978.

EVERSON, C.; BERGMANN, B.M.; RECHTSCHAFFEN, A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep.* 12:12-21, 1989.

EVERSON, C. Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav. Brain Res.* 69:43-54, 1995.

FONTANA, P.; BOUTELLIER, U.; KNÖPFLI-LENZIN, C. Time to exhaustion at maximal lactate steady state is similar for cycling and running in moderately trained subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 107:187–192, 2009.

GABRIEL, H.; SCHWARZ, L.; BORN, P.; KINDERMANN, W. Differential mobilization of leucocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 65:529-534, 1992.

GLESSON, M.; BLANNUN, A.K.; SEWELL, D.A.; CAVE, R. Short-term changes in the blood leucocyte and platelet count following different durations of high-intensity treadmill running. *J. Sports Sci.*, 13:115-123, 1995.

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. A: Mol. Integr. Physiol.* 130:21–27, 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Textbook of medical physiology. 11th edition. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006.

IKEDA, M.; SAGARAB, M.; INOUÉ, S. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 279:185-189, 2000.

JACOBS, G.H.; FENWICK J.A.; WILLIAMS, G.A. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J. Exp. Biol.* 204:2439–2446, 2001.

KENDALL, A.; HOFFMAN-GOETZ, L.; HOUSTON, M.; MACNEIL, B.; ARUMUNGAM, Y. Exercise and blood lymphocyte subset responses: Intensity, duration and subject fitness effects. *J. Appl. Physiol.* 69:251-260, 1990.

KENNEDY, S.L.; SMITH, T.P.; FLESHNER, M. Resting Cellular and Physiological Effects of Freewheel Running. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37(1):79-83, 2005.

LEPROULT, R.; COMPINSCHI, G.; BUXTON, O.; VAN CAUTER, E. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep.* 20:865-870, 1997.

LIPPI, G.; BANFI, G.; MONTAGNANA, M.; SALVAGNO, G.L.; SCHENA, F.; GUIDI, G.C. Acute variation of leucocytes counts following a half-marathon run. *Int. Jnl. Lab. Hem.* (32):117–121, 2010.

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* 8:29–35, 2005.

MCARDLE, W.D.; MONTROYE, H.J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J. Appl. Physiol.* 21(4):1431-1434, 1966.

NIEMAN, D.C.; NEHLSEN-CANNARELLA, S.L. The immune response to exercise. *Semin. Hematol.* 31:166-79, 1994.

NIEMAN, D.C.; PEDERSEN, B.K. Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med.* 27:73–80, 1999.

OLIVEIRA, A.C.; D'ALMEIDA, V.; HIPÓLIDE, D.C.; NOBREGA, J.N.; TUFIK, S. Sleep deprivation reduces total plasma homocysteine levels in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80:193-197, 2002.

PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H.; KLOKKER, M.; KAPPEL, M.; MACLEAN, D.A.; NIELSEN, H.B.; ROHDE, T.; ULLUM, H.; ZACHO, M. Exercise-induced immunomodulation: possible roles of neuroendocrine factors and metabolic factors. *Int. J. Sports Med.* 18(1):S2–S7, 1997.

PILNY, A.A. Clinical Hematology of Rodent Species. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 11:523–533, 2008.

PITTENDRIGH, C.S.; DAAN, S.A. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291–331, 1976.

POLAT, Y. Effects of zinc supplementation on hematological parameters of high performance athletes. *Af. J. Pharmacy Pharmac.* 5(12):1436-1440, 2011.

PORTALUPPI, F.; SMOLENSKY, M.H.; TOUITOU, Y. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol. Int.* 27:1911–1929, 2010.

SCHUMACHER, Y.O.; SCHMID, A.; GRATFIWOHL, D.; BÜLTERMANN, D.; BERG, A. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34(5):869-865, 2002.

SEELAENDER, M.C.; KAZANTZIS, M.; COSTA ROSA, L.F.B.P. The effect of adrenaline and Walker-256 tumour-induced cachexia upon Kupffer cell metabolism. *Cell. Biochem. Funct.* 17:151–6, 1999.

SMAALAND, R.; SOTHERN, R.B.; LAERUM, O.D.; ABRAHAMSEN, J.F. Rhythms in human bone marrow and blood cells. *Chronobiology International.* 19(1):101–127, 2002.

SPATCH-SCHWALBE, E.; HUNDENBORN, C.; KERN, W.; FEHM, H.; BORN, J. Nocturnal wakefulness inhibits growth hormone (GH)- releasing hormone-induced GH secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:214-219, 1995.

STRASNER, A.; DAVIS, J.M.; KOHUT, M.L.; PATE, R.R.; GHAFFAR, A.; MAYER, E. Effects of exercise intensity on natural killer cell activity in women. *Int. J.Sports Med.* 18:56-62, 1997.

SUN, J.H.; YAGA, K.; REITER, R.J.; GARZA, M.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; POEGGELER, B. Reduction in pineal N-acetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels in rats after their exposure to red light at night. *Neurosci Lett.* 149(1):56-8, 1993.

TANAKA, H.; YANASE, M.; KANOSUE, K.; NAKAYAMA, T. Circadian variation of thermoregulatory responses during exercise in rats. *Am. J. Physiol. (Regul. Integr. Comp. Physiol.* 258):836-841, 1990.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Medical Biological Res.* 35, 1–6, 2002.