

**VALIDADE DO TESTE DO LACTATO MÍNIMO PARA A DETERMINAÇÃO
DO LIMIAR ANAERÓBIO EM RATOS DURANTE EXERCÍCIO DE
NATAÇÃO**

FABRICIO AZEVEDO VOLTARELLI

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista (UNESP), como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade (Área de
Biodinâmica da Motricidade Humana)**

**RIO CLARO
Estado de São Paulo-Brasil
Agosto / 2005**

**VALIDADE DO TESTE DO LACTATO MÍNIMO PARA A DETERMINAÇÃO
DO LIMIAR ANAERÓBIO EM RATOS DURANTE EXERCÍCIO DE
NATAÇÃO**

FABRICIO AZEVEDO VOLTARELLI

Orientadora: Profa. Dra. MARIA ALICE ROSTOM DE MELLO

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista (UNESP), como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade (Área de
Biodinâmica da Motricidade Humana)**

**RIO CLARO
Estado de São Paulo-Brasil
Agosto / 2005**

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DA LITERATURA	2
3- OBJETIVO	8
CAPÍTULO 1: VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Glicogênio muscular e limiar anaeróbico determinado em ratos durante natação. Revista Motriz de Educação Física. (10): 35-40, 2004.	11
CAPÍTULO 2: VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Limiar anaeróbico determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: efeito dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. Revista Portuguesa de Ciências do Desporto (4) 3: 16-25, 2004.	30
CAPÍTULO 3: VOLTARELLI, F.A; NUNES, W.M.S; SILVA, A.S.R; ROMERO, C.E.M; GARCIA, D.R; PAULI, J.R; SANTHIAGO, V; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determinação do limiar anaeróbico em ratas obesas tratadas com glutamato monossódico (MSG). Revista Logos. 11: 84-92, 2003.	55
CAPÍTULO 4: VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Lactato mínimo e proteína muscular de ratos durante exercício de natação (Minimum lactate and muscle protein of rats during swimming exercise. Biology of Sports. (submetido à publicação), 2005.	79
4- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS	102
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
6- ABSTRACT	112

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Silvio Voltarelli e Elizabeth Azevedo Voltarelli, pelo amor e apoio incondicional em todos esses anos de muito empenho e busca de meus ideais e sonhos nessa vida. Vocês são muito importantes para mim. Amo vocês, obrigado por tudo e continuem sempre assim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus e à minha Santa Protetora que ilumina meus caminhos, Nossa Senhora da Aparecida, por me darem saúde, perseverança e terem colocado em minha vida tantas pessoas importantes e especiais antes, durante e depois da realização deste trabalho e que terei a oportunidade de aqui agradecer-los.

Faço aqui um agradecimento muito especial à minha orientadora e Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello, que além de ser uma profissional muito competente naquilo que faz é uma pessoa de grande coração e amiga e que tem e terá, sem sombra de dúvida, uma parcela enorme na minha formação, tanto como acadêmico, pesquisador e pessoa. Obrigado de coração!

Agradeço imensamente o órgão de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, a FAPESP, pela concessão do apoio financeiro e por acreditar em nosso projeto de pesquisa. Gostaria de agradecer, também, o parecerista responsável pela análise dos relatórios científicos referentes ao projeto, visto que suas sugestões e críticas foram de grande valia para o enriquecimento e andamento do presente trabalho assim como para pertinentes investigações futuras.

À minha querida irmã Vanessa, a Vany, que, apesar da distância nesses anos todos, sempre me apoiou nessa caminhada e que agora está começando sua vida universitária. Serão novas pessoas, novos amigos, novas experiências, enfim, torço muito pelo seu sucesso (você sabe disso) e quero que saiba que sempre contará com meu apoio para o que der e vier. Boa sorte na nova vida e obrigado pelo seu carinho!

Ao amor da minha vida, Marisa, ou simplesmente Má, minha querida noiva e companheira há 4 anos. 4 anos de muito amor, carinho, companheirismo, amizade, bons e maus momentos, enfim, uma pessoa muito, mas muito importante para mim e com quem terei muito orgulho e felicidade de construir uma família, ter ela como mãe de meus filhos. Você, minha linda, é uma das grandes responsáveis pela realização desse sonho, você sabe disso. Continue sempre assim, tenho muito orgulho de você, como profissional, pessoa e amada. Te amo! Te amo! Te amo...preciso muito de você! Obrigado por existir!

Gostaria de agradecer também meus sogros Jurandyr e Jeane, pessoas extremamente especiais, pelo apoio que me deram durante todo esse tempo. Seja ele em minhas viagens (quantas vezes me levaram e buscaram na rodoviária e aeroporto), em meus congressos em São Paulo, em passeios, enfim, vocês são de uma bondade rara. Agradeço aqui, de coração, o apoio que deram ao meu pai quando ele precisou. Jamais irei esquecer tal gesto. Estejam com Deus!

Aos meus cunhados Wilian e Ricardo e respectivas esposas, Mary e Ana Paula, pela amizade e bons momentos juntos, embora vocês não tenham tido, vamos assim dizer, bom gosto para escolherem o time de futebol ideal para torcerem. Mas mesmo assim, obrigado por tudo!

Ao Prof^o. Dr^o. Claudio Alexandre Gobatto, o Claudião, como é carinhosamente conhecido, pelo apoio em todos esses anos, pela amizade, pelas sugestões sempre valiosas para o enriquecimento de meus trabalhos e por ter se disponibilizado em ser membro de minha Banca de Dissertação de Mestrado. Valeu Claudio, brigadão. Obs: Você sim escolheu o time de futebol certo para torcer!

À Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, profissional extremamente competente, pela participação em minha Banca de Dissertação de Mestrado e pelo apoio que vem me concedendo, mesmo que seja a distância, na realização de um trabalhos já pronto (que me proporcionou uma participação em um Congresso na Itália) e aos que ainda estão por vir. Obrigado

Aos professores do Departamento de Educação Física da UNESP CAMPUS RIO CLARO-SP, em especial aos que participaram, efetivamente, na minha formação tanto na graduação como agora no Mestrado: Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello, Profº. Drº. Claudio Alexandre Gobatto (Claudião), Profº. Drº. Carlos Anaruma (Pitoco), Profº. Drº. Francisco Pereira Santi (Chico), Profº. Drº. José Roberto Moreira de Azevedo (Zé Roberto), Profº Drº Eduardo kokubun (Edu), Profa. Dra. Eliete Luciano, Profº. Drº Sebastião Gobbi, Profa. Dra. Lilian Gobbi e Profa. Dra. Angelina Zanesco. Obrigado a todos vocês!

Aos técnicos de laboratório Clarice Sibuya, Eduardo Custódio (China) e José Roberto Rodrigues (Beto) pela amizade e apoio nos mais diversos trabalhos, incluindo sacrifícios, dosagens, incubações, enfim, sem vocês as coisas seriam muito complicadas. Continuem sempre assim, amigos e competentes, e muitíssimo obrigado!

Aos meus amigos/irmãos da graduação, com quem dividi república em momentos que ficarão para sempre na memória: Macalé, Preto, Mumu e Ipatinga! Agradeço também aos amigos e amigas da graduação: Clayton, Carlão, Fred, Leandrinho, Edmar, Mamão, Splinter, Bililo, Cara-Gorda, Zé-Garotinho, Mamão, Brunão, Júlio Sarah, Helena, Joyce, Malú, Thaís, Keit, Maíra, Paula, Vanessa, Michele, Larissa, Camila e Luciana.

Aos amigos da Pós-Graduação: Serelepe, Adelino, Vanessa, Carla, Wonder, Chicão, Tito, Preto, Ricardo, Élton, Leandrinho, Ipatinga, Gustavo, Ricardo Bariri, Papoti, Tam, Lili, Fúlvia, Ico, Alê, Jean, Marcel, Caraguá, Fernandão, Bauru, Felipinho, Gleber, Camila Oliveira, Camila Moraes, Paula, Vanessa, Jimi, e Débora. Agradeço também os estagiários de iniciação científica da Educação Física: Maurício, André Miojo, Gustavão (Carlitos), Carla, Natália e Priscilinha; e da Biologia: Amanda e Clécia. Obrigado a todos pela amizade e pela ajuda quando muito precisei.

Tenho a satisfação de agradecer o pessoal da Biblioteca, do Xérox, da Seção de Pós-Graduação, à secretária da Revista Motriz (Cristina), às secretárias do Departamento de Educação Física (Rosângela e Adriana) e aos funcionários do R.U. e da Cantina (afinal de contas, estudar de estômago vazio não dá). Valeu gente.

Agradeço também meus bichos de estimação, o papagaio Lorinho, que está comigo há 23 anos, e à cachorrinha Mel, que tanta alegria trouxe para meu lar.

Por fim, agradeço todos aqueles, amigos, colegas e familiares, que fizeram e fazem parte de minha vida e que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADO A TODOS!!!

RESUMO

Limiar anaeróbio (Lan) pode ser definido como a carga de trabalho na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular durante exercícios progressivos e, supostamente, indica a carga de trabalho correspondente à máxima fase estável de lactato (MFEL). O Lan é considerado um bom indicador do condicionamento aeróbio em seres humanos mas pouco se sabe sobre esse índice em ratos. O presente estudo teve por objetivo determinar o Lan pelo teste do lactato mínimo (TLM) em ratos adultos durante exercício de natação. Além disso, visou verificar se o Lan assim determinado: a) sofre influência dos estoques musculares de glicogênio; b) é sensível às alterações do condicionamento aeróbio decorrentes do treinamento físico c) é aplicável a animais portadores de transtorno metabólico e d) é sensível às alterações do metabolismo protéico muscular durante exercício de natação em intensidades inferior, equivalente e superior ao Lan. O TLM baseia-se no fato de que durante exercício progressivo iniciado após sessão de exercício intenso, o lactato sanguíneo decresce a um valor mínimo para depois elevar-se. Tal valor mínimo indica a carga de trabalho equivalente ao Lan. O teste teve início com a colocação dos animais em tanque cheio d'água suportando sobrecarga de 50% do peso corporal (pc) para exercitarem-se (saltos) por 6 minutos (30s de atividade interrompidos por 30s de repouso), visando elevação do lactato sanguíneo. Após 9 min de repouso, os animais iniciaram exercício de natação com cargas progressivas. A carga inicial foi de 4,0% do pc e foi acrescida de 0,5% a cada 5 min, até a exaustão. A cada troca de carga, foram coletadas amostras de sangue para dosagem de lactato. Em outra série de testes, os animais foram submetidos a 20 ou 30 minutos de natação suportando carga constante e equivalente ao Lan, para checar a

ocorrência de estabilidade da concentração de lactato sanguíneo. A cada 5 min de exercício, foram coletadas amostras de sangue para dosagem de lactato. O TLM foi aplicado em ratos sob diferentes condições: sedentarismo, treinamento físico, depleção de glicogênio muscular (Jejum de 12 ou 48 horas), distúrbio metabólico (obesidade induzida por glutamato monossódico). Foi também avaliado quanto aos efeitos do exercício de natação realizado em intensidades inferior, equivalente e superior ao Lan. De acordo com os resultados obtidos: a) o treinamento físico aumentou a carga de trabalho correspondente ao Lan e reduziu a concentração sanguínea de lactato nessa carga, indicando que o TLM foi sensível às alterações do condicionamento aeróbio impostas pelo treinamento; b) a depleção dos estoques de glicogênio muscular pelo jejum não alterou a carga de trabalho equivalente ao Lan mas reduziu a concentração sanguínea na qual o mesmo apareceu; c) a redução da densidade corporal causada pela obesidade não mudou a carga de trabalho na qual o Lan é observado, mas diminuiu a concentração de lactato sanguíneo nessa carga, mostrando a viabilidade do TLM em animais com distúrbio metabólico; d) o TLM mostrou-se sensível às alterações do metabolismo protéico impostas pelo exercício; e) em todos os casos, houve estabilização do lactato sanguíneo durante exercício realizado na intensidade equivalente ao Lan determinado pelo TLM e f) tomados em conjunto, os resultados do presente estudo indicam a reprodutibilidade e fidedignidade do teste e sugerem a viabilidade do TLM na determinação do Lan em ratos.

LISTA DE ABREVIATURAS

(de acordo com o aparecimento ao longo do texto)

- **Lan – Limiar Anaeróbio**
- **MFEL – Máxima Fase Estável de Lactato**
- **TLM – Teste do Lactato Mínimo**
- **pc – peso corporal**
- **LSM – Lactato Sanguíneo Mínimo**
- **MSG – Glutamato Monossódico**
- **AT – Anaerobic Threshold**
- **LS – Lactato Sanguíneo**
- **BL – Blood Lactate**
- **bw – body weight**
- **LMT – Lactate Minimum Test**
- **IMC – Índice de Massa Corporal**
- **GH – Hormônio do Crescimento**
- **MBL – Minimum Blood Lactate**
- **BSA – Albumina Sérica Bovina Desengordurada**
- **TCA – Ácido Tricloroacético**

ESTE TRABALHO CONTOU
COM O APOIO FINANCEIRO
DA FUNDAÇÃO DE
AMPARO À PESQUISA DO
ESTADO DE SÃO PAULO



(PROCESSO N°: 02/10296-0)

1- INTRODUÇÃO

Limiar Anaeróbio (Lan) pode ser definido como a carga de trabalho na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular exponencialmente durante exercícios progressivos e, teoricamente, indica a carga de trabalho correspondente à máxima fase estável de lactato (MFEL). A MFEL equivale a mais alta concentração sanguínea de lactato onde sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante exercício com carga constante. Foi relatada coincidência entre Lan e MFEL em humanos durante vários tipos de exercício, mas não em todos. Independente disso, o Lan é considerado bom indicador do condicionamento aeróbio e tem sido utilizado na prescrição de treinamento em diferentes modalidades de exercício.

Por razões óbvias, grande número de pesquisas envolvendo o treinamento têm sido conduzidas em animais de laboratório, especialmente o rato, utilizadas para a determinação da intensidade de esforço. Contudo, tal procedimento é limitado pela pouca informação acerca da cinética do lactato no exercício em ratos, pois são raríssimos os estudos que discutem protocolos de testes para a determinação do Lan nesses animais.

2- REVISÃO DA LITERATURA

O consumo máximo de oxigênio ($VO_{2 \text{ max}}$) tem sido empregado como índice de aptidão física e preditor do desempenho em exercícios de longa duração (MITCHELL; BLOQUIST, 1971). Programas de treinamento para exercícios de longa duração têm sido elaborados com o objetivo de aumentar o $VO_{2 \text{ max}}$. Nas últimas décadas ficou demonstrado que o Limiar Anaeróbio (LAN) é, também, bom preditor do desempenho em exercício de longa duração e da aptidão física (SJODIN; JACOBS, 1981).

Em 1964, Wasserman e Mc. Ilroy empregaram o termo Limiar Anaeróbio no sentido que, durante o exercício, o aumento abrupto do CO_2 reflete numa mudança metabólica em direção ao sistema anaeróbio. Kinderman et al. (1979), após realização de testes de exercícios com cargas progressivas em atletas bem condicionados, postularam a existência do Lan marcado quando a concentração sanguínea de lactato atinge 4,0mmol/L. Estudos anteriores já haviam demonstrado que o Lan corresponde ao aumento exponencial do lactato sanguíneo em resposta a uma carga de exercício (MADER et al., 1986). Posteriormente, Sjodin e Jacobs (1981) consideraram a concentração sanguínea de lactato de 4,0mmol/L como “início do acúmulo de lactato sanguíneo” (OBLA). Isto é, durante testes de exercícios com cargas progressivas, com avaliações simultâneas de lactato sanguíneo e intensidade de

exercício, a carga correspondente a 4,0mmol/L de lactato equivale ao máximo desempenho aeróbio (VOBLA). Este último pode ser calculado através da curva de análise de regressão lactato sanguíneo/intensidade de exercício.

Em 1985, Heck e colaboradores realizaram testes de exercícios com carga constante, em humanos, e avaliaram o lactato sanguíneo. Esses autores observaram que, independentemente da capacidade aeróbia individual, uma MFEL era atingida com 4,0mmol/L de lactato sanguíneo.

Apesar das inúmeras tentativas, as bases fisiológicas para o acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício ainda não foram totalmente elucidadas. Em estudos recentes, a hipótese de que a formação de lactato durante o exercício submáximo seja devido a hipóxia tecidual foi questionada. Estudos demonstraram que mesmo frente a cargas moderadas de exercício (50-75% do $VO_{2\text{ max}}$) e, portanto, com concentrações intracelulares adequadas de oxigênio, já ocorre acúmulo de lactato tanto no músculo quanto no sangue (BROOKS, 1985; CAMPBELL et al., 1989). Pesquisas com cães mostraram, também, que há acúmulo de lactato nos músculos em cargas tão baixas quanto 10% do $VO_{2\text{ max}}$ (CONETT et al., 1981). Tais evidências contestam a relação causa/efeito entre produção de lactato e hipóxia tecidual, sugerindo algum outro fator que não a limitação na oferta de oxigênio como responsável pelo aumento da produção muscular de lactato no exercício. Apesar disso, a determinação de “limiares”, isto é, determinação da intensidade de exercício na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular exponencialmente, tem-se mostrado ferramenta útil na prescrição de exercícios (SJODIN; JACOBS, 1981).

Para fins práticos, o Lan tem sido empregado submetendo-se o sujeito a esforços com cargas progressivamente mais elevadas e concomitante avaliação da

concentração do lactato sanguíneo. A determinação do Lan pode ser feita baseando-se no desvio da linha de base da concentração circulante de lactato ou na intensidade de trabalho correspondente a uma concentração fixa de lactato circulante. O primeiro método fundamenta-se no fato de que o aumento não linear da concentração de lactato sanguíneo em relação à intensidade do exercício indica a transição do metabolismo, conforme definiram Wasserman e Mc. Ilroy (1964) e Kinderman et al. (1979). Já o segundo procedimento assume o princípio de que até uma determinada concentração circulante de lactato (4,0mmol/L), ocorre um equilíbrio entre a produção muscular e a remoção desse substrato da circulação, conforme postulou Heck et al. (1985).

Vários estudos apontam elevada correlação entre a velocidade de corrida correspondente ao Lan e a velocidade de corrida na maratona (FARREL, 1979; SJODIN; JACOBS, 1981). Foi ainda constatado que a velocidade correspondente ao Lan poderia ser atingida durante 50 minutos ou mais de corrida (STEGGMAN; KINDERMAM, 1982). Constatou-se, também, que a maior eficiência para o treinamento em natação (MADER et al., 1986), ciclo ergômetro (DENIS, 1982) e esteira rolante (PIERRE, 1990), ocorre em intensidade de exercício correspondente ao Lan.

Em 1993, Tegtbur et al. desenvolveram um teste para a determinação do Lan, denominado teste do lactato mínimo (TLM). Esse teste envolve a realização pelos sujeitos de exercício supramáximo, por um breve período de tempo, visando a indução de hiperlactacidemia antes do início do teste padrão com cargas progressivas em esteira rolante. Lactato sanguíneo mínimo (LSM) foi definido como a velocidade na qual a curva em forma de “U” obtida com os dados de lactato sanguíneo durante o teste

progressivo atinge o nadir. Esse valor mínimo de lactato sanguíneo supostamente indica o limiar de lactato (JONES; DOUST, 1998).

Após a proposta inicial, este teste vem sendo expressivamente investigado, uma vez que parece oferecer vantagens sobre métodos correntemente empregados para a estimativa do Lan. As mais importantes são que o LSM pode ser determinado objetivamente através da aplicação de uma tangente zero-grau a uma função “spline” que ajuste a resposta do lactato sanguíneo ao teste de exercício com cargas progressivas (JONES; DOUST, 1998) e que, aparentemente, o LSM não é afetado por condições de depleção de glicogênio muscular (TEGTBUR et al., 1993). O TLM foi considerado sensível às modificações da capacidade aeróbia pelo treinamento físico em algumas circunstâncias (TEGTBUR et al., 1993; BACON; KERN, 1999; SIMÕES et al., 2000), mas não em todas (JONES; DOUST, 1998; CARTER; JONES, 1999).

A determinação do Lan tem-se mostrado, também, valiosa em estudos clínicos (WASSERMAN; Mc. ILROY, 1964; NEIVA et al., 1999). Uma vez que existem limitações óbvias nas pesquisas com seres humanos, em especial nos estudos clínicos, modelos animais têm fornecido importantes informações quanto à origem e as conseqüências de certas patologias, incluindo obesidade (SCALFANI, 1988), diabetes (LUCIANO; MELLO, 1999) e desnutrição (GALDINO et al., 2000). O exercício físico, por sua vez, tem sido considerado ferramenta importante no tratamento de obesidade, diabetes (IVY et al., 1999) e desnutrição (TORUN; VITERI, 1994). Nesse sentido, estudos dos efeitos do exercício em modelos animais dessas patologias podem contribuir para o desenvolvimento de procedimentos mais efetivos de tratamento para os mesmos.

Uma vez que existem diferenças metabólicas entre seres humanos e ratos, é razoável especular sobre potenciais diferenças entre espécies com respeito ao fluxo de lactato durante o exercício. Ainda que os mesmos princípios gerais que regulam o fluxo de lactato sejam válidos para ambas as espécies, pode haver diferenças quantitativas em algumas variáveis entre elas. No caso da corrida em esteira para rato, a intensidade do exercício pode ser elevada pelo aumento da velocidade. Isto possibilitou a determinação do Lan nesse tipo de exercício, o qual foi atingido a 4,0mmol/L de lactato sanguíneo (PILLIS et al., 1993; LANG FORT et al., 1996).

Em protocolo de natação, exercício progressivo pode ser obtido pela adição de sobrecargas progressivamente mais pesadas em relação ao peso corporal, atadas ao tórax ou à cauda do animal (GOBATTO et al., 1991). A utilização do exercício de natação apresenta vantagens sobre a corrida em esteira, uma vez que a natação é uma habilidade natural do rato. Isto evita seleção de animais, que se faz necessária nos protocolos de exercício em esteira. A maior limitação dos protocolos de natação para o rato é a dificuldade de identificação da intensidade do exercício realizado pelo animal. Em estudo publicado em 2001, nosso grupo de pesquisa estabeleceu um protocolo para a determinação do Lan em ratos durante exercício de natação em teste com cargas fixas visando a obtenção da MFEL (GOBATTO et al., 2001). Nesse estudo, a MFEL foi obtida com os animais exercitando-se suportando cargas equivalentes a 5-6% do peso corporal, quando a concentração sanguínea de lactato atingiu 5,5 mmol/L. O fator limitante desse protocolo é o fato de envolver vários testes, realizados ao longo de mais de duas semanas. Isso inviabiliza sua aplicação em algumas condições especiais como gestação e lactação, que no rato têm a duração de 3 semanas cada uma e, ainda, em animais portadores de tumores malignos, por exemplo. Uma vez que o TLM requer

apenas um teste realizado em um único dia, poderia ser usado como procedimento alternativo adequado à determinação do Lan em ratos durante a natação. Dessa forma, nosso grupo desenvolveu um segundo estudo visando estabelecer um protocolo para a determinação do Lan em ratos durante a natação utilizando o TLM (VOLTARELLI et al., 2002). Nesse estudo, o Lan foi estimado na carga de $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal enquanto que o lactato sanguíneo interpolado foi de $7,17 \pm 0,16$ mmol/L. Tendo em vista que, teoricamente, o Lan indica a carga de trabalho correspondente à MFEL (HECK et al., 1985), nesse mesmo estudo, foi checada a ocorrência de estabilização do lactato sanguíneo nos ratos durante exercício de natação suportando carga fixa equivalente ao Lan estimado pelo TLM. Houve estabilização do lactato sanguíneo, porém a uma concentração inferior ($6,41 \pm 0,30$ mmol/L) ao LSM obtido no TLM (VOLTARELLI et al., 2002).

Esses dados levantaram questionamentos quanto à correspondência entre Lan e MFEL em ratos durante exercício de natação. Tais questionamentos procedem, uma vez que o pressuposto de que o Lan indica a carga de trabalho equivalente a MFEL mostrou-se verdadeiro, em humanos, em alguns tipos de exercícios, como corrida em esteira rolante e cicloergometria (STEGGMAN; KINDERMAM, 1982; HECK et al., 1985), mas não em todos. A carga de exercício na MFEL parece diferir daquela no Lan na ergometria de braço (KRUGER et al., 1990) e no remo (BENEKE, 1995). Assim, uma hipótese que não pode ser descartada é que em ratos, durante exercício de natação, possa haver diferença na carga de trabalho entre MFEL e Lan.

3- OBJETIVO

Existem muitos pontos que permanecem obscuros e necessitam de esclarecimento antes do emprego, com finalidades práticas, do TLM para estimar o Lan em ratos. A depleção dos estoques de glicogênio muscular pode reduzir a concentração de lactato sanguínea a uma dada carga de exercício? Seria a intensidade de exercício equivalente ao Lan determinada pelo TLM afetada pela redução do glicogênio muscular? Seria o Lan assim determinado sensível às modificações do condicionamento físico aeróbio ocasionados pelo treinamento físico nesses animais? Seria possível, ainda, determinar o Lan de animais com distúrbios metabólicos aplicando-se o TLM? Além disso, o exercício de natação realizado em intensidades inferior, equivalente e superior à transição metabólica provocaria alterações no metabolismo protéico de ratos eutróficos e sedentários?

Visando esclarecer alguns desses pontos, o presente estudo foi delineado para avaliar a validade do TLM na determinação do Limiar Anaeróbio de ratos durante exercício de natação.

Para atingir esse objetivo, foram realizados quatro (4) estudos, todos já concluídos.

Estudo 1: “Glicogênio Muscular e Limiar Anaeróbio Determinado em Ratos Durante a Natação”, objetivou verificar a relação entre os estoques de glicogênio muscular e Lan

determinado pelo TLM em ratos durante exercício de natação. Este estudo foi publicado na **Revista Motriz – Revista de Educação Física** (10): 35-40, Rio Claro/SP, 2004.

Estudo 2: “Limiar Anaeróbio Determinado pelo Teste do Lactato Mínimo em Ratos: Efeito dos Estoques de Glicogênio Muscular e do Treinamento Físico”, buscou verificar a reprodutibilidade das respostas do Lan determinado pelo TLM, se o mesmo sofre influência da redução dos estoques de glicogênio muscular. Visou, também, avaliar a sensibilidade do TLM às alterações do condicionamento aeróbio decorrentes do treinamento em exercício de natação na carga equivalente ao Lan individual. Este estudo foi publicado na **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, (4) 3: 16-25, Porto, Portugal – DEZ/2004.

Estudo 3: “Determinação do Limiar Anaeróbio em Ratas Obesas Tratadas com Glutamato Monossódico (MSG)”, teve como objetivo determinar o Lan de ratas com distúrbio metabólico (obesidade por tratamento com MSG) através do TLM durante exercício de natação. Este estudo foi publicado na **Revista Logos** (11): 84-92, São José do Rio Pardo/SP, 2003.

Estudo 4: Trata-se de um estudo complementar, intitulado “Lactato Mínimo e Proteína Muscular de Ratos Durante Exercício de Natação”, que objetivou analisar os efeitos do exercício de natação em intensidades inferior, equivalente e superior ao Lan determinado pelo TLM sobre o metabolismo protéico de ratos. O manuscrito referente a este estudo foi traduzido para a língua inglesa e submetido para publicação na revista polonesa *Biology of Sport*, com o seguinte título: *Minimum Lactate and Muscle Protein of Rats During Swimming Exercise* (2005).

Os 4 artigos científicos já concluídos serão apresentados a seguir, na forma de Capítulos, na presente Dissertação de Mestrado.

CAPÍTULO 1

VOLTARELLI, F. A; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Glicogênio muscular e limiar anaeróbio determinado em ratos durante natação. **Revista Motriz de Educação Física** (10): 35-40, 2004.

RESUMO

Limiar Anaeróbio (Lan) pode ser definido como a carga de trabalho na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular exponencialmente durante exercícios progressivos. Em humanos, o Lan, determinado pelo teste do lactato mínimo (TLM), sofre influência da redução dos estoques de glicogênio muscular, pois ocorre em concentrações mais baixas de lactato sanguíneo, embora a carga de trabalho não se altere. Faltam informações quanto a esse aspecto em animais de laboratório. O presente estudo visou verificar os efeitos da redução do teor de glicogênio muscular, induzido pelo jejum de 48 horas, sobre o Lan estimado pelo TLM em ratos. A resposta dos animais foi semelhante àquela descrita na literatura para seres humanos, ou seja, a depleção dos estoques de glicogênio muscular não alterou a carga de trabalho equivalente ao Lan, mas reduziu a concentração sanguínea na qual o mesmo ocorreu.

palavras – chave: limiar anaeróbio, ratos, natação, glicogênio muscular, jejum

ABSTRACT

Anaerobic threshold (AT) can be defined as the workload in which blood lactate starts to accumulate exponentially during incremental exercises. In human beings, the AT, determined by lactate minimum test (LMT), receives influence of reduction of the muscle glycogen stores as it occurs at lower blood lactate concentrations. On the other hand, the workload is not modified. The literature lacks information on this subject in laboratory animals. The present study aimed to verify the effects of reduction of the muscle glycogen stores, induced by 48 hours fast, on the AT determined by LMT in rats. The response of the animals was similar that described in the literature for human beings, i.e., the depletion of the muscle glycogen stores did not modify the workload equivalent to the AT, but reduced the blood lactate concentration in which it occurred.

Key words: anaerobic threshold, rats, swimming, muscle glycogen, fast

INTRODUÇÃO

Limiar anaeróbio (Lan) pode ser definido como a carga de trabalho na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular exponencialmente durante exercícios progressivos e é considerado bom indicador do condicionamento aeróbio e tem sido utilizado na prescrição de treinamento em diferentes modalidades de exercício (WASSERMAN; Mc. ILROY, 1964; KINDERMAN et al., 1979; TEGTBUR et al., 2001).

Tegtbur et al. (1993) desenvolveram um protocolo de teste para a determinação do Lan, denominado teste do lactato mínimo (TLM). Esse teste envolve a realização de exercício supramáximo, por um breve período de tempo, visando a indução da hiperlactacidemia antes do início do teste padrão com cargas progressivas em esteira rolante. Lactato sanguíneo mínimo (LSM) foi definido como a velocidade na qual a curva em forma de “U”, obtida com os valores de lactato sanguíneo durante o teste progressivo, atinge o nadir. Esse valor mínimo de lactato sanguíneo supostamente indica o Lan (JONES; DOUST, 1998; TEGTBUR et al., 1993; RIBEIRO et al., 2003).

Por razões óbvias, grande número de pesquisas envolvendo o exercício físico tem sido conduzido em animais de laboratório, especialmente o rato e as concentrações de lactato, utilizadas para a determinação da intensidade de esforço. Como existem diferenças metabólicas entre seres humanos e ratos, é razoável especular sobre potenciais diferenças entre espécies com respeito ao fluxo de lactato e outras variantes durante o exercício. Apesar da importância do problema, ainda são raros os estudos que tratam da cinética de lactato em ratos durante o exercício.

Uma vez que a determinação do lactato mínimo requer apenas um teste realizado em um único dia, poderia ser adequado à obtenção do Lan em ratos durante exercício de natação. Dessa forma, nosso grupo recentemente desenvolveu estudos visando padronizar um protocolo para a determinação do Lan em ratos durante a natação utilizando os princípios do TLM estabelecidos por Tegtbur et al. (1993). Em nosso estudo, o Lan médio calculado dos animais foi obtido na carga de $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal, enquanto que a concentração média de lactato sanguíneo foi obtida, nessa carga, à $7,17 \pm 0,16$ mmol/L (VOLTARELLI et al., 2002).

Existem, ainda, outros pontos que permanecem obscuros e necessitam de esclarecimento antes do emprego, com finalidades práticas, do TLM para estimar o Lan em ratos. Conforme demonstrado em seres humanos, a depleção dos estoques de glicogênio muscular pode reduzir a concentração de lactato sanguíneo a uma dada carga de exercício (TEGTBUR et al., 1993). Com base nessas informações, seriam intensidade de exercício e concentração sanguínea de lactato equivalentes ao Lan determinado pelo TLM, em ratos, afetadas pela redução do glicogênio muscular?

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo verificar a relação entre teor reduzido de glicogênio muscular e Lan determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos durante exercício de natação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, adultos (90-100 dias de idade) sedentários, cujas mães eram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) e foram alimentados com ração comercial (Purina®) para roedores e água *ad libitum* bem como mantidos sob ciclo periódico claro e escuro de 12 horas à temperatura média de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Adaptação ao meio líquido: A adaptação consistiu em manter o animal em contato com água rasa à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 3 semanas, 5 dias por semana por 30

minutos. Nas 2ª e 3ª semanas de adaptação, os mesmos suportaram sobrecargas de chumbo inseridas em “mochilas” de pano fechadas com velcro® e atadas ao tórax com o auxílio de um elástico (VOLTARELLI et al., 2002). O propósito da adaptação foi reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água (GOBATTO et al., 2001).

TLM adaptado às condições do rato: Inicialmente, os animais foram colocados no tanque cheio d'água suportando sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal e exercitaram-se, anaerobiamente (saltos), durante 6 minutos (30 segundos de exercício interrompidos por 30 segundos de repouso), para a elevação da concentração de lactato sanguíneo circulante. Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício de natação com intensidades progressivamente maiores (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 % do peso corporal), com duração de 5 minutos de exercício em cada carga. Antes do início do teste (repouso) e a cada troca de carga, foram coletadas amostras de sangue (25µl) para a determinação do lactato no Analisador Eletroquímico YSL® modelo 1500 SPORT, Yellow Spring, OH, USA. A curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho, para cada rato, determinada no teste, foi obtida por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de um programa de computador (MICROSOFT OFFICE - EXCEL®). Procedeu-se, então, a determinação matemática, pela análise da função, do menor valor da concentração de lactato sanguíneo e respectiva carga de trabalho. Esse menor valor indicou o Lan individual.

Jejum: Tegtbur et al. (1993) demonstraram, em sujeitos humanos, que embora os valores de lactato sanguíneo sejam mais baixos em condições de depleção do glicogênio muscular, isso não afeta a intensidade equivalente ao Lan determinado pelo TLM. Essa série de testes foi efetuada para verificar se estoques normais ou baixos de glicogênio

muscular nos ratos antes do início da aplicação do teste, alterariam a intensidade de exercício equivalente ao Lan. Para isso, os animais foram submetidos a jejum de 48 horas, condição que sabidamente depleta os estoques de glicogênio muscular (LI et al., 1993) e avaliados quanto ao Lan através do TLM. Imediatamente após a realização do teste, os animais foram sacrificados e o músculo sóleo da pata direita foi removido para determinação das concentrações de glicogênio. Animais no estado alimentado foram simultaneamente submetidos ao TLM, sacrificados e analisados quanto ao teor de glicogênio do músculo sóleo. Para fins de comparação, foi também avaliado o teor de glicogênio no músculo sóleo de ratos no estado alimentado e/ou após jejum de 48 horas, sacrificados em repouso.

Grupos Experimentais: De acordo com o estado alimentar e a execução ou não de teste de esforço, formaram-se quatro (4) grupos experimentais: Jejum/Exercício (J/E), Alimentado/Exercício (A/E), Jejum/Repouso (J/R) e Alimentado/Repouso (A/R).

Determinação do teor de glicogênio do músculo sóleo de ratos: Imediatamente após a realização do TLM (grupos J/E e A/E) e/ou em repouso (grupos J/R e A/R), os animais foram decapitados e exanguinados. Alíquotas de tecido do músculo sóleo foram separadas para determinação do glicogênio pelo método colorimétrico com fenol e ácido sulfúrico (LO, S et al., 1970).

Análise Estatística: Os dados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão. Foi utilizada Análise de Variância (ANOVA), seguida de BONFERRONI, e Teste t-student. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

As Figuras 1 e 2 mostram os valores do Lan calculados através da equação polinomial de grau 2 que definiu a curva lactato sanguíneo (mmol/l) vs carga de trabalho (% peso corporal), para um rato de cada grupo (J/E e A/E) durante o TLM de natação. A título de exemplo, o Lan individual calculado do animal do grupo J/E foi obtido na carga de 4,93% do peso corporal, na concentração de 4,65mmol/l de lactato sanguíneo (Figura 1). Em relação ao grupo A/E, o Lan individual calculado para o animal ocorreu na carga de 4,89% do peso corporal à uma concentração de 6,41mmol/l de lactato sanguíneo (Figura 2).

A Tabela 1 contém os valores individuais e médios referentes à carga de exercício (% do peso corporal) e concentração de lactato sanguíneo (mmol/L) equivalentes ao Lan individual dos animais pertencentes aos grupos Alimentado e Jejum de 48 horas estimados pelo TLM.

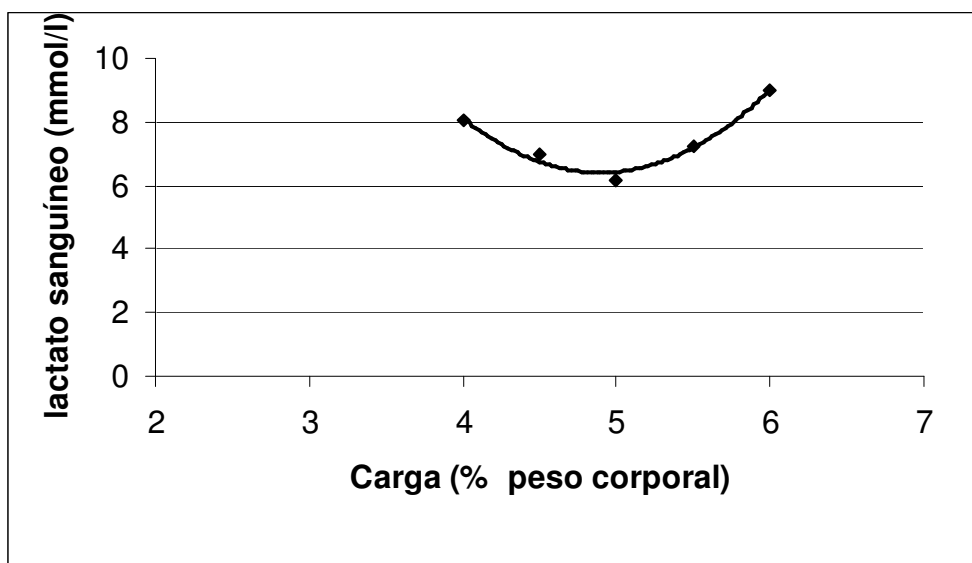


Figura 1: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo de um rato do grupo Alimentado/Exercício (A/E). A curva foi obtida por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). A equação $y = 2,1286x^2 - 20,848x + 57,454$, que define a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo (6,41mmol/L) e respectiva carga de trabalho (4,89% do peso corporal). Esse menor valor de lactato sanguíneo indica a carga de trabalho equivalente ao Lan.

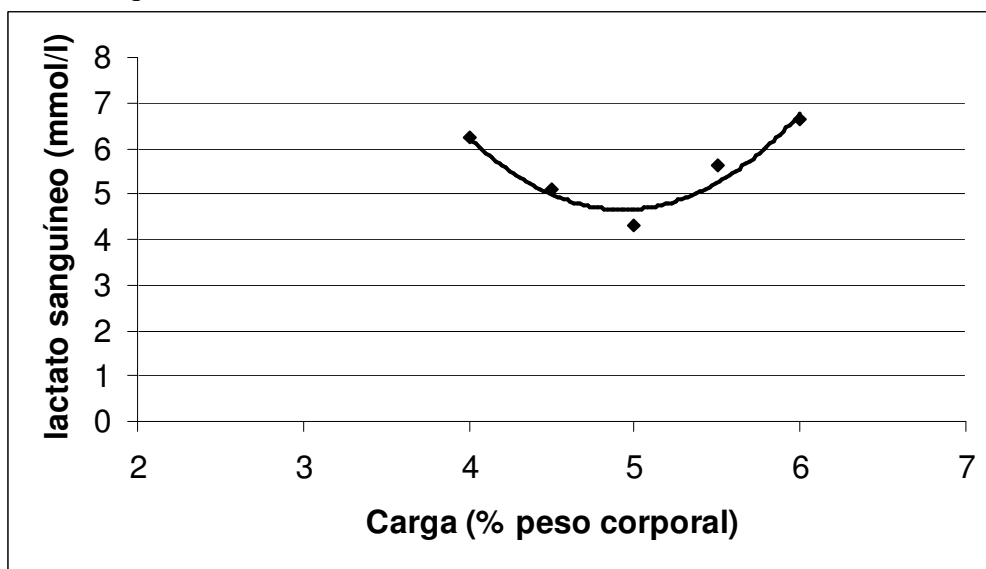


Figura 2: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo de um rato do grupo Jejum de 48 horas/Exercício (J/E). A curva foi obtida por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). A equação $y = 1,8314x^2 - 18,056x + 49,156$, que define a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo (4,65mmol/L) e respectiva carga de trabalho (4,93% do peso corporal). Esse menor valor de lactato sanguíneo indica a carga de trabalho equivalente ao Lan.

Tabela 1: Valores de lactato sanguíneo (mmol/L) e carga de trabalho referentes ao Limiar Anaeróbio individual dos grupos Alimentado Exercício (A/E) e Jejum de 48 horas Exercício (J/E) durante o TLM.

A/E	Carga	Lactato Sanguíneo
Rato 1	4,92	6,57
Rato 2	4,91	6,42
Rato 3	4,91	6,83
Rato 4	4,93	6,52
Rato 5	4,96	6,67
Rato 6	4,92	6,44
Rato 7	4,89	6,41
Média±	4,92±	6,55±
DP	0,022	0,154
J/E		
Rato 1	4,84	4,94
Rato 2	4,85	4,83
Rato 3	4,85	4,78
Rato 4	4,83	4,67
Rato 5	4,87	5,12
Rato 6	4,93	4,89
Rato 7	4,93	4,65
Média±	4,87±	4,84±*
DP	0,042	0,163

DP= Desvio Padrão

* $p < 0,05$ em relação aos valores de lactato sanguíneo do grupo A/E

A Tabela 2 mostra os valores médios de glicogênio tecidual (mg/100mg) do músculo sóleo dos animais pertencentes aos grupos sacrificados em repouso (J/R e A/R) e imediatamente após a realização do TLM de natação (J/E e A/E). As concentrações de glicogênio do músculo sóleo do grupo J/R foram significativamente menores em relação ao grupo A/R. As taxas de glicogênio do músculo sóleo referentes ao grupo A/E mostraram-se significativamente maiores em relação ao grupo J/E.

Tabela 2: Teores de glicogênio (mg/100mg) no músculo sóleo dos animais nas situações: estado Alimentado Exercício (A/E), sacrificados após o TLM; estado Alimentado, sacrificados em repouso (A/R); Jejum de 48 horas Exercício (J/E), sacrificados após o TLM e Jejum de 48 horas, sacrificados em repouso (J/R).

	A/E	A/R	J/E	J/R
Média	0,092	0,128	0,039**	0,050*
Desvio Padrão	0,003	0,011	0,002	0,002
n	7	5	7	5

TLM= Teste do Lactato Mínimo

* $p < 0,05$ em relação à situação A/R

** $p < 0,05$ em relação à situação A/E

DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras tentativas, as bases fisiológicas para o acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício ainda não foram totalmente elucidadas. Em diferentes estudos, a hipótese de que a formação de lactato durante o exercício submáximo seja devida a hipóxia tecidual foi questionada. Na verdade, esses estudos sugerem que os dados experimentais existentes possam ser interpretados de maneira alternativa e que a formação de lactato durante o exercício submáximo é consequência da redução na disponibilidade de oxigênio na mitocôndria (KHATZ; SAHLIN, 1990; BROOKS, 2000). Apesar disso, a determinação de “limiares”, isto é, determinação da intensidade de exercício na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular exponencialmente, denominado Limiar Anaeróbio (Lan), tem-se mostrado ferramenta

útil na prescrição de exercícios (SJODIN; JACOBS, 1981; JONES; CARTER, 2000; BILLAT et al., 2003).

Para fins práticos, o Lan tem sido empregado submetendo-se o sujeito a esforços com cargas progressivamente mais elevadas e concomitante avaliação da concentração do lactato sanguíneo. A determinação do Lan pode ser feita baseando-se no desvio da linha de base da concentração circulante de lactato ou na intensidade de trabalho correspondente a uma concentração fixa de lactato circulante. O primeiro método fundamenta-se no fato de que o aumento não linear da concentração de lactato sanguíneo em relação à intensidade do exercício indica a transição do metabolismo, conforme definiram Wasserman e Mc. Ilroy (1964), Kinderman et al. (1979) e Simões et al. (2000). Já o segundo procedimento assume o princípio de que até uma determinada concentração circulante de lactato, ocorre um equilíbrio entre a produção muscular e a remoção desse substrato da circulação, conforme postulou Heck et al. (1985).

A determinação do Lan tem-se mostrado, também, valiosa em estudos clínicos (WASSERMAN; Mc. ILROY, 1964; NEIVA et al., 1999). Uma vez que existem limitações óbvias nas pesquisas com seres humanos, em especial nos estudos clínicos, modelos animais têm fornecido importantes informações quanto à realização de exercício físico sob diversas condições experimentais, incluindo obesidade (SCALFANI, 1988), diabetes (LUCIANO; MELLO, 1999), desnutrição (GALDINO et al., 2000) e jejum (STEVANATO, 1999).

A proposta principal do presente estudo foi verificar a relação entre teor reduzido de glicogênio muscular (induzido pelo jejum de 48 horas) e Lan determinado pelo teste do lactato mínimo (TLM) em ratos durante exercício de natação.

No TLM originalmente descrito por Tegtbur et al. (1993) para humanos, a acidose láctica inicial foi induzida em atletas por duas corridas exaustivas consecutivas. A segunda corrida foi seguida por 8 minutos de recuperação (andar lento). Em seguida, foi iniciado o teste progressivo de corrida.

Com base nessas informações, desenvolvemos, em nosso laboratório, um teste para determinar o Lan durante exercício de natação, utilizando os princípios básicos do TLM proposto por Tegtbur et al. (1993), adaptado às condições do rato (VOLTARELLI et al., 2002). O Lan, nesse último estudo (VOLTARELLI et al., 2002), foi obtido na carga média calculada de $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal do animal na concentração média de lactato sanguíneo calculada de $7,17 \pm 0,16 \text{ mmol/l}$.

Os valores calculados de intensidade de exercício e lactato sanguíneo, correspondentes ao Lan, de apenas um rato do grupo A/E do presente estudo estão contidos na figura 1. Como se pode observar, a carga de exercício e concentração de lactato sanguíneo, equivalentes ao Lan, determinados nesse animal, mostraram-se semelhantes aos valores obtidos por Voltarelli et al. (2002). O mesmo foi observado nos valores médios do grupo. Tais resultados sugerem potencial aplicação deste procedimento em estudos que visem a prescrição de exercício de natação para ratos. Contudo, antes da adoção do teste com esta finalidade, é necessário conhecer melhor as respostas metabólicas decorrentes da aplicação dessa técnica, de maneira semelhante a que ocorreu com o teste originalmente proposto para seres humanos (TEGTBUR et al., 1993).

Uma das etapas do estudo desenvolvido por Tegtbur et al. (1993), mostra que a depleção dos estoques de glicogênio muscular pode reduzir a concentração

de lactato sanguíneo a uma dada carga de exercício durante a realização do TLM por humanos. Os sujeitos deste estudo (TEGTBUR et al., 1993) realizaram o teste com estoques normais (dieta rica em carboidrato (CHO) + repouso um dia antes do teste, para assegurar que os estoques de glicogênio muscular não fossem depletados) e reduzidos (dieta pobre em CHO + exercício de alta intensidade um dia antes do teste, procedimento no qual a redução dos estoques de glicogênio muscular é esperada BONEM et al., 1985; GREENHAFF et al., 1988) de glicogênio muscular. Com base nessas informações, submetemos os animais ao jejum de 48 horas, condição que sabidamente depleta os estoques de glicogênio muscular (LI et al., 1993) e os avaliamos quanto ao Lan através do TLM.

Como podemos observar na Tabela 2, o jejum de 48 horas foi eficaz em reduzir, significativamente, os estoques de glicogênio muscular nos ratos do grupo J/R quando comparados ao grupo A/R, mimetizando nos animais a condição de redução de estoque de glicogênio muscular proposta no estudo de Tegtbur et al. (1993) com seres humanos.

No estudo de Tegtbur et al. (1993), a carga de trabalho (velocidade de corrida) correspondente ao Lan dos sujeitos de ambos os grupos (dieta rica em CHO = 4,7m/s e pobre em CHO = 4,7m/s) não foi alterada quando da realização do TLM. Em contrapartida, a concentração de lactato sanguíneo, correspondente ao Lan dos sujeitos, foi obtida em níveis consideravelmente menores no grupo que recebeu dieta pobre em CHO ($3,1 \pm 1,7$ mmol/l) quando comparada ao grupo que recebeu dieta rica em CHO ($3,7 \pm 2,2$ mmol/l), corroborando achados anteriores descritos por Massen e Busse (1989).

No presente estudo com animais, podemos observar, nas Figuras 1 e 2, que o comportamento dos resultados, tanto de carga de trabalho quanto de lactato sanguíneo, foram equivalentes aos encontrados por Tegtbur et al. (1993). A carga de trabalho correspondente ao Lan do animal pertencente ao grupo J/E (Figura 2) foi semelhante à determinada no animal do grupo A/E (Figura 1). No entanto, a concentração de lactato sanguíneo, correspondente ao Lan do animal do grupo J/E apresentou-se significativamente menor em relação ao valor obtido no animal do grupo A/E. A mesma diferença foi observada nos valores médios calculados, referentes ao Lan, do grupo J/E quando comparados com os resultados do grupo A/E (Tabela 1).

Resultados que demonstram a influência dos estoques de glicogênio muscular na concentração de lactato sanguíneo durante o exercício estão contidos na Tabela 2. Podemos observar que os valores médios dos teores de glicogênio obtidos do músculo sóleo do grupo J/E mostram-se em níveis significativamente menores quando comparados aos valores médios da mesma variável do grupo A/E. A menor concentração de lactato sanguíneo, equivalente ao Lan, apresentada pelos animais do grupo J/E pode, então, ser explicada pela diminuição de 32% no conteúdo total de glicogênio do músculo sóleo de ratos submetidos ao jejum de 48 horas em relação aos alimentados. Tal situação, sabidamente, reduz oxidação de carboidratos, a síntese de glicogênio, e, principalmente, a menor produção muscular de lactato (LI et al., 1993). Por outro lado, a intensidade (carga de exercício) equivalente ao Lan não foi afetada pela redução dos estoques musculares de glicogênio, indicando a fidedignidade da técnica utilizada para estimá-lo.

CONCLUSÃO

- O Lan de ratos submetidos à redução dos estoques de glicogênio muscular foi obtido em carga de exercício (% do peso corporal) semelhante à de ratos controle alimentados. Em contrapartida, a concentração de lactato sanguíneo (mmol/l) na carga de exercício equivalente ao Lan foi menor.
- A resposta observada nos ratos foi semelhante àquela descrita na literatura para seres humanos, ou seja, a depleção dos estoques de glicogênio muscular não alterou a carga de trabalho equivalente ao Lan, mas reduziu a concentração de lactato sanguíneo, na qual o mesmo apareceu.
- Em conjunto, estas informações indicam a fidedignidade da técnica aqui descrita para a estimativa do Lan em ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLAT, V.L.; SIRVENT, P.; KORALSZTEIN, J.P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science (review). **Sports Medicine**. 33(6): 407-426, 2003.

BONEM, A; NESS, G.W; BELCASTRO, A.N; KIRBY, R.L. Mild exercise impedes glycogen repletion in muscle. **Journal of Applied Physiology**. 58: 1622-1629, 1985.

BROOKS, G.A. Intra-and extracellular lactate shuttles. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 32: 790-799, 2000.

GALDINO, R. S.; SOUZA, C. C. A.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Protein calorie malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to physical exercise. **Nutrition Research**. 20, 257-535, 2000.

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**. 130: 21-27, 2001.

GREENHAFF, P.L; GLEESON, M; MAUGHAN, R.J. Diet-induced metabolic acidosis and the performance of high intensity exercise in man. **European Journal Applied Physiology**. 57: 583-590, 1988.

HECK, H; A. MADER; G. HESS; S. MUCK and W, HOLLMAN. Justification of the 4,0 mmol/L lactate threshold. **International Journal of Sports Medicine**. 6: 117-130, 1985.

JONES, A. M. and CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Medicine**. 29: 373-376, 2000.

JONES, A. M. and J. H. DOUST. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 Km running performance. **Medicine Science of Sports Exercise**. 30: 1304 – 1313, 1998.

KHATZ, A. and SAHLIN, K. Role of oxygen in regulation of glycolysis and lactate production in human skeletal muscle. **Exercise Sports Science**. 19 (39): 1-28, 1990.

KINDERMAN, W; G. SIMON and J, KEUL. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **European Journal of Applied Physiology**. 42: 25-34, 1979.

LI, JING; STILLMAN, J.S; CLORE, J.N; BLACKARD, W.G. Skeletal muscle lipids and glycogen mask substrate competition (Randle cycle). **Metabolism**. 42 (4): 451-456, 1993.

LO, S; RUSSEL, J.C; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**. 28 (2): 234-236, 1970.

LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteína em músculos de ratos diabéticos. **Revista Paulista de Educação Física**. 12: 202-209, 1999.

MAASSEN, N; BUSSE, M.W. The relationship between lactic acid and work load – a measure for endurance capacity or an indicator of carbohydrate deficiency? **European Journal of Applied Physiology**. 58: 728-737, 1989.

NEIVA, C.M; BUNC, V; MELLO, M. Glicemia, insulinemia e trigliceridemia de ratos diabéticos experimentais e alimentados com dieta hiperlipídica, submetidos a

treinamento físico por aeróbio e anaeróbio. **Revista Científica da Universidade de Franca**- 201-210, 1999.

RIBEIRO, L; BALIKIAN, P; MALACHIAS, P; BALDISSERA, V. Stage length, spline function and lactate minimum swimming speed. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**. 43(3): 312-318, 2003.

SCALFANI, A. Animal models of obesity: classification and characterization. **Zutern Journal of Obesity**. 8: 497-508, 1984.

SIMÕES, H.G; CAMPBELL, C.S.G; TANGO, M.H; MELLO, F; MAZIERO, D.C; BALDISSERA, V. Lactate minimum test in swimming relationship to performance and maximal lactate steady state. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 32: S161, 2000.

SJODIN, B. and I, JACOBS. On set of blood lactate accumulation and marathon running performance. **International Journal of Sports Medicine**. 2: 23-26, 1981.

STEVANATO, E. Efeitos do jejum sobre a interação entre o metabolismo de ácidos graxos livres e glicose em músculo esquelético de ratos treinados. **Dissertação de Mestrado**, UNESP- Rio Claro-SP, 1999.4

TEGTBUR, U; M. W. BUSSE and K. M. BRAUMANN. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise . **Medicine Science of Sports Exercise**. 25: (5): 620-627, 1993.

TEGTBUR, U; MACHOLD, H; MEYER, H; STORP, D; BUSSE, M.W. Determining the extent of extensive physical performance in patients with coronary heart disease. **Zeitschrift fur Kardiologie**. 90: 637-645, 2001.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35: 1389 - 1394, 2002.

WASSERMAN, K. and M. B. MC. ILROY. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **American Journal of Cardiology**. 14: 844-852, 1964.

CAPÍTULO 2

VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Limiar anaeróbio determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: efeito dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto** (4) 3: 16-25, DEZ/2004.

RESUMO

O presente estudo visou verificar, em ratos: a) o efeito do teor de glicogênio muscular sobre o limiar anaeróbio (Lan) estimado pelo teste do lactato mínimo (TLM) em ratos e b) avaliar a sensibilidade do TLM às alterações do condicionamento aeróbio decorrentes do treinamento físico. Foram utilizados ratos Wistar, adultos (90 dias), adaptados ao meio líquido. Para avaliar os efeitos dos estoques de glicogênio muscular, o TLM foi realizado nos animais no estado alimentado (A) e após jejum de 12 horas (J). No que diz respeito ao treinamento físico, foram avaliadas 3 situações: Condição Sedentária (C/S), Treinamento de 4 semanas (T4) e Treinamento de 8 semanas (T/8). Os ratos treinados foram submetidos a exercícios de natação, 5 dias por semana, 1 hora por dia, suportando sobrecarga (% peso corporal – pc) equivalente ao Lan individual por 4 e 8 semanas. Os valores médios do Lan para os grupos J (n=7) e A (n=7) foram de $4,90 \pm 0,08$ e $4,88 \pm 0,06\%$ do pc nas concentrações de $5,51 \pm 0,37$ e $6,65 \pm 0,27$ mmol/l de lactato sanguíneo (LS), respectivamente. Os valores

médios de Lan na situação C/S (n=16; $4,93\pm 0,07\%$ do pc à $7,39\pm 0,39$ mmol/L de LS) foram melhorados com T/4 (n=16; $5,42\pm 0,01\%$ do pc à $6,38\pm 0,12$ mmol/L de LS) e T/8 (n=16; $5,98\pm 0,02\%$ do pc à $5,89\pm 0,14$ mmol/L de LS). De acordo com os resultados: a) a depleção dos estoques de glicogênio muscular não alterou a carga de trabalho equivalente ao Lan, mas reduziu a concentração sanguínea de lactato na qual o mesmo apareceu e b) o Lan determinado pelo TLM foi sensível às modificações do condicionamento físico aeróbio dos animais.

Palavras-chave: LIMAR ANAERÓBIO, ESTOQUE DE GLICOGÊNIO MUSCULAR, TREINAMENTO FÍSICO, RATOS, NATAÇÃO

ABSTRACT

The present study aimed to verify, in rats: a) the effect of the muscle glycogen stores on the anaerobic threshold (AT) determined by lactate minimum test (LMT) in rats and b) to evaluate the sensitivity of the LMT to the alterations of the aerobic conditioning induced by physical training. Adult Wistar rats adapted in the water during 3 weeks were used. For the evaluation of the influence of muscle glycogen stores, the LMT was performed by the animals in the fed state (FE) and after a 12 hour fast (FA). For evaluation of the effects of training, 3 situations were considered: Sedentary condition (S/C), 4 week training (4w/T) and 8 week training (8w/T). Trained rats were submitted to swimming exercise, 5 days per week, 1 hour per day, supporting overload (% body weight – bw) equivalent to the individual AT for 4 e 8 weeks. The average values of the AT for groups FA (n=7) and FE (n=7) were of $4,90\pm 0,08$ and $4,88\pm 0,06\%$ of bw at concentrations of $5,51\pm 0,37$ and $6,65\pm 0,27$ mmol/l of blood lactate (BL), respectively. The average values of AT in the situation S/C (n=16; $4,93\pm 0,07\%$ of

bw at $7,39 \pm 0,39$ mmol/L of BL) were improved by 4w/T (n=16; $5,42 \pm 0,01\%$ of bw to $6,38 \pm 0,12$ mmol/L of BL) and 8w/T (n=16; $5,98 \pm 0,02\%$ of bw to $5,89 \pm 0,14$ mmol/L of BL). In accordance with the results: a) the depletion of the muscle glycogen stores did not modify the workload equivalent to the AT, but reduced the blood lactate concentration in which it appeared and b) the Lan determined by the LMT was sensible to modifications of the aerobic physical conditioning of the animals.

Key Words: ANAEROBIC THRESHOLD, MUSCLE GLYCOGEN STORES, PHYSICAL TRAINING, RATS, SWIMMING

INTRODUÇÃO

Limiar anaeróbio (Lan) pode ser definido como a carga de trabalho na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular exponencialmente durante exercícios progressivos, é considerado bom indicador do condicionamento aeróbio e tem sido utilizado na prescrição de treinamento em diferentes modalidades de exercício (WASSERMAN; Mc ILROY, 1964; KINDERMAN et al., 1979; JONES; CARTER, 2000).

Tegtbut et al. (1993) desenvolveram um protocolo de teste para a determinação do Lan, denominado teste do lactato mínimo (TLM). Esse teste envolve a realização de exercício supramáximo, por um breve período de tempo, visando a indução da hiperlactacidemia antes do início do teste padrão com cargas progressivas em esteira rolante. Lactato sanguíneo mínimo (LSM) foi definido como a velocidade na qual a curva em forma de “U”, obtida com os valores de lactato sanguíneo durante o

teste progressivo, atinge o nadir. Esse valor mínimo de lactato sanguíneo supostamente indica o Lan (JONES; DOUST, 1998).

Recentemente, Ribeiro et al. (2003) realizaram um estudo aplicando o TLM (estímulo anaeróbio de 50 metros e etapa progressiva equivalente a 300 metros, com coleta de sangue a cada 50 metros) em seres humanos treinados durante exercício de natação e que foram aleatoriamente submetidos a cinco avaliações por um período de 2 semanas visando a determinação do Lan desses sujeitos. O valor médio referente ao Lan desses sujeitos (n=12) foi obtido na intensidade de $1,28 \pm 0,11 \text{ m/s}^{-1}$ na concentração de $5,5 \pm 2,2 \text{ mmol/L}$ de LS.

Por razões óbvias, grande número de pesquisas envolvendo o exercício físico tem sido conduzido em animais de laboratório, especialmente o rato e as concentrações de lactato, utilizadas para a determinação da intensidade de esforço. Como existem diferenças metabólicas entre seres humanos e ratos, é razoável especular sobre potenciais diferenças entre espécies com respeito ao fluxo de lactato e outras variantes durante o exercício. Apesar da importância do problema, ainda são raros os estudos que tratam da cinética de lactato em ratos durante o exercício.

Uma vez que a determinação do lactato mínimo requer apenas um teste realizado em um único dia, poderia ser adequado à obtenção do Lan em ratos durante exercício de natação. Dessa forma, nosso grupo recentemente desenvolveu estudos visando padronizar um protocolo para a determinação do Lan em ratos durante a natação utilizando os princípios do TLM estabelecidos por Tegtbur et al. (1993). Em nosso estudo, o Lan médio calculado dos animais foi obtido na carga de $4,95 \pm 0,10\%$ do

peso corporal à concentração sanguínea de lactato de $7,17 \pm 0,16$ mmol/L (VOLTARELLI et al., 2002).

Existem, ainda, pontos que permanecem obscuros e necessitam de esclarecimento antes do emprego, com finalidades práticas, do TLM para estimar o Lan em ratos. Conforme demonstrado em seres humanos, a depleção dos estoques de glicogênio muscular pode reduzir a concentração de lactato sanguíneo a uma dada carga de exercício (TEGTBUR et al., 1993). Com base nessas informações, seriam intensidade de exercício e concentração sanguínea de lactato equivalentes ao Lan determinado pelo TLM, em ratos, afetadas pela redução do glicogênio muscular? Além disso, seria o Lan assim determinado sensível às modificações do condicionamento físico aeróbio ocasionados pelo treinamento físico nesses animais? Dessa forma, o presente estudo foi delineado com a finalidade de: a) verificar se o Lan determinado pelo teste do lactato mínimo sofre influência da redução dos estoques de glicogênio muscular (induzido por jejum de 12 horas), visto que a depleção do glicogênio muscular pode reduzir a concentração de lactato sanguíneo em uma dada carga de exercício e b) avaliar a sensibilidade do teste do lactato mínimo às alterações do condicionamento aeróbio decorrentes do treinamento em exercício de natação na carga equivalente ao Lan individual determinada em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, adultos (90-100 dias de idade), eutróficos e sedentários, cujas mães eram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) e foram alimentados com ração comercial

(Purina®) para roedores e água *ad libitum* bem como mantidos sob ciclo periódico claro e escuro de 12 horas à temperatura média de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Adaptação ao Meio Líquido: a adaptação consistiu em manter o animal em contato com água rasa à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 3 semanas, 5 dias por semana por 30 minutos. Nas 2^a e 3^a semanas de adaptação, os mesmos suportaram sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal (VOLTARELLI et al., 2002). O propósito da adaptação foi reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água.

Teste do Lactato Mínimo (TLM): a determinação do Lan pelo TLM, conforme proposto para humanos (TEGTBUR et al., 1993; JONES; DOUST, 1998), consiste em: a) um período breve de exercício de alta intensidade para provocar um aumento de lactato sanguíneo circulante; b) um período breve de recuperação para assegurar a hiperlactacidemia e c) um protocolo de teste de exercício com cargas progressivas, com coleta de sangue para análise de lactato a cada carga. Uma vez que a porção progressiva do TLM começa quando o sujeito apresenta níveis altos de lactato sanguíneo, a mesma produz um perfil de lactato sanguíneo característico, em forma de “U”. O LSM foi definido como a intensidade de exercício na qual a “curva em forma de U”, derivada dos valores de lactato sanguíneo obtidos durante o TLM, atinja o nadir. Partindo dos princípios desse protocolo, o teste foi adaptado em nosso laboratório para as condições do rato (VOLTARELLI et al., 2002) e empregado no presente estudo, com pequenas modificações, para a determinação do Lan dos animais.

TLM Adaptado às Condições do Rato: inicialmente, os animais foram colocados no tanque cheio d'água suportando sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal e exercitaram-se, anaerobiamente (saltos), durante 6 minutos (30 segundos de exercício

interrompidos por 30 segundos de repouso), para a elevação da concentração de lactato sanguíneo circulante. Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício de natação com intensidades progressivamente maiores (4,0; 4,5; 5,0, 5,5 e 6,0 % do peso corporal), com duração de 5 minutos de exercício em cada carga. Antes do início do teste (repouso) e a cada troca de carga, foram coletadas amostras de sangue (25µl) para a determinação do lactato no Analisador Eletroquímico YSL® modelo 1500 SPORT, Yellow Spring, OH, USA. A curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho, para cada rato, determinada no teste, foi obtida por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de um programa de computador (MICROSOFT OFFICE - EXCEL®). Procedeu-se, então, a determinação matemática, pela análise da função, o menor valor da concentração de lactato sanguíneo e respectiva carga de trabalho. Esse menor valor indicou o Lan individual.

Jejum: Tegtbur et al. (1993) demonstraram em sujeitos humanos, que embora os valores de lactato sanguíneo sejam mais baixos em condições de depleção do glicogênio muscular, isso não afeta a intensidade equivalente ao Lan determinado pelo TLM. Essa série de testes foi efetuada para verificar se estoques normais ou baixos de glicogênio muscular nos ratos antes do início da aplicação do teste, alterariam a intensidade de exercício equivalente ao Lan. Para isso, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas, condição que sabidamente depleta os estoques de glicogênio muscular e avaliados quanto ao Lan através do TLM. Imediatamente após a realização do teste, os animais foram sacrificados e o músculo sóleo da pata direita foi removido para determinação das concentrações de glicogênio (LO S et al., 1970). Animais no estado alimentado foram simultaneamente submetidos ao TLM, sacrificados e analisados quanto ao teor de glicogênio do músculo sóleo. Para fins de comparação, foi também

avaliado o teor de glicogênio no músculo sóleo de ratos no estado alimentado e/ou após jejum de 12 horas, sacrificados em repouso.

Treinamento físico: esse procedimento foi realizado utilizando-se outro lote de animais e teve como propósito verificar a sensibilidade do teste do lactato mínimo às mudanças do condicionamento aeróbio decorrentes do treinamento. Para isso, os ratos foram submetidos por 8 semanas a exercícios de natação em tanques coletivos (100cmx80cmx80cm), contendo água a 30-32°C, 5 dias por semana, suportando sobrecarga equivalente ao Lan individual. Ao final do período de 4 semanas de treinamento os animais foram novamente submetidos ao TLM. Esse procedimento foi realizado afim de se ajustar a carga de treinamento equivalente ao Lan individual dos ratos (necessário para dar continuidade ao processo de treinamento) e verificar possíveis modificações na cinética do lactato sanguíneo decorrentes do treinamento físico. Finalizadas as 8 semanas de treinamento, os animais foram mais uma vez avaliados pelo TLM para identificação das mudanças no condicionamento aeróbio (carga de exercício/% do peso corporal e concentração de lactato sanguíneo/mmol/L).

Dessa forma, para avaliar os efeitos do treinamento físico, os animais foram avaliados em 3 situações: Sedentária, Treinamento por 4 semanas e Treinamento por 8 semanas. Os mesmos animais foram submetidos a todas as situações.

Teste de Natação com Carga Fixa Equivalente ao Lan: foi realizado um teste de natação onde os animais suportaram carga fixa equivalente ao Lan durante 30 minutos (GOBATTO et al., 2001), visando verificar se o lactato sanguíneo estabilizar-se-ia nessa intensidade de exercício pois, teoricamente, o Lan coincide com a máxima fase estável de lactato (BILLAT et al., 2001). Foram coletadas amostras sanguíneas durante o teste

para a determinação do lactato a cada 5 minutos de exercício. Esse procedimento experimental foi efetuado 48 horas após os animais realizarem o primeiro (condição sedentária), o segundo (4 semanas de treinamento) e o terceiro (final da etapa de treinamento de 8 semanas) TLM.

Análise Estatística: os dados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão. Os procedimentos estatísticos incluíram Análise de Variância (ANOVA), seguida de BONFERRONI, onde apropriado. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Jejum

A Figura 1 mostra os valores do Lan calculados através da equação polinomial de grau 2 que definiu a curva lactato sanguíneo (LS) (mmol/L) vs carga de trabalho (% peso corporal-pc), para um rato em cada situação (Jejum e estado Alimentado) durante o TLM de natação. O Lan individual calculado do animal no estado Alimentado foi obtido na carga de 4,97% % do pc, na concentração de 6,61mmol/L de LS. Em relação ao animal em Jejum, o Lan individual calculado ocorreu na carga de 4,99% do pc à concentração de 5,94mmol/l de LS. Os valores médios do Lan calculados para as situações Jejum (n=7) e estado Alimentado (n=7) foram de $4,90 \pm 0,08$ e $4,88 \pm 0,06$ % de carga em relação ao peso corporal, nas concentrações de $5,51 \pm 0,37$ e $6,65 \pm 0,27$ mmol/L de lactato sanguíneo, respectivamente.

A Tabela 1 mostra as concentrações de glicogênio no músculo sóleo dos animais nas seguintes situações: estado Alimentado, sacrificados após o TLM; estado

Alimentado, sacrificados em repouso; Jejum de 12 horas, sacrificados após o TLM e Jejum de 12 horas, sacrificados em repouso. As concentrações médias de glicogênio foram sempre significativamente inferiores nos animais jejuados.

Treinamento Físico

A Figura 2 mostra os efeitos do treinamento físico de natação sobre o condicionamento aeróbio de apenas um rato suportando carga equivalente ao Lan individual, a título de exemplo. O Lan foi calculado através da equação polinomial de grau 2 que definiu a curva LS (mmol/L) *vs* carga de trabalho (% do pc). O Lan individual desse animal, quando em Situação Sedentária, foi obtido na carga de 5,05% do pc à 6,47 mmol/L de LS. Após 4 semanas de treinamento físico houve melhora nas magnitudes referentes ao Lan individual desse rato, ou seja, o valor da carga de exercício aumentou e a concentração de LS apresentou declínio (5,41% do pc à 6,32 mmol/L de LS). O mesmo comportamento foi observado ao final das 8 semanas de treinamento físico de natação onde o Lan individual foi obtido na carga de 5,97% do pc na concentração de 5,80 mmol/L de LS. Os valores médios do Lan calculados para todos os ratos na Situação Sedentária (n=16), Treinamento 4 Semanas (n=16) e Treinamento 8 Semanas (n=16) foram de $4,93 \pm 0,07$, $5,42 \pm 0,01$ e $5,98 \pm 0,02\%$ de carga em relação ao peso corporal, nas concentrações de $7,39 \pm 0,39$, $6,38 \pm 0,12$ e $5,89 \pm 0,14$ mmol/L de lactato sanguíneo, respectivamente.

Visando verificar a estabilização do lactato sanguíneo durante o exercício, efetuou-se um teste de natação (30 minutos) com carga fixa equivalente ao Lan individual nas situações Sedentária e após treinamento por 4 e 8 semanas. Os resultados obtidos para o mesmo animal da Figura 2 são apresentados na Figura 3. Na

situação Sedentária, a concentração de LS estabilizou-se em $6,25 \pm 0,03$ mmol/L na carga de 5,05% do pc. Após 4 semanas de treinamento, a concentração de LS estabilizou-se em valor inferior ($6,05 \pm 0,03$ mmol/L) quando comparada com a situação Sedentária, enquanto que a carga de exercício se elevou (5,41% do pc). Após 8 semanas de treinamento, a concentração de LS estabilizou-se em $5,49 \pm 0,04$ mmol/L na carga de 5,97% do pc. Fato semelhante foi verificado em relação aos valores médios calculados para o conjunto de animais ($n=16$ em cada situação), tanto para a carga de trabalho (% do pc) (situação Sedentária= $4,93 \pm 0,09$, Treinamento 4 Semanas= $5,42 \pm 0,01$ e Treinamento 8 Semanas= $5,98 \pm 0,02$) quanto para as concentrações médias de lactato sanguíneo (mmol/L) (situação Sedentária= $6,66 \pm 0,37$, Treinamento 4 Semanas= $6,10 \pm 0,05$ e Treinamento 8 Semanas= $5,51 \pm 0,15$ mmol/L).

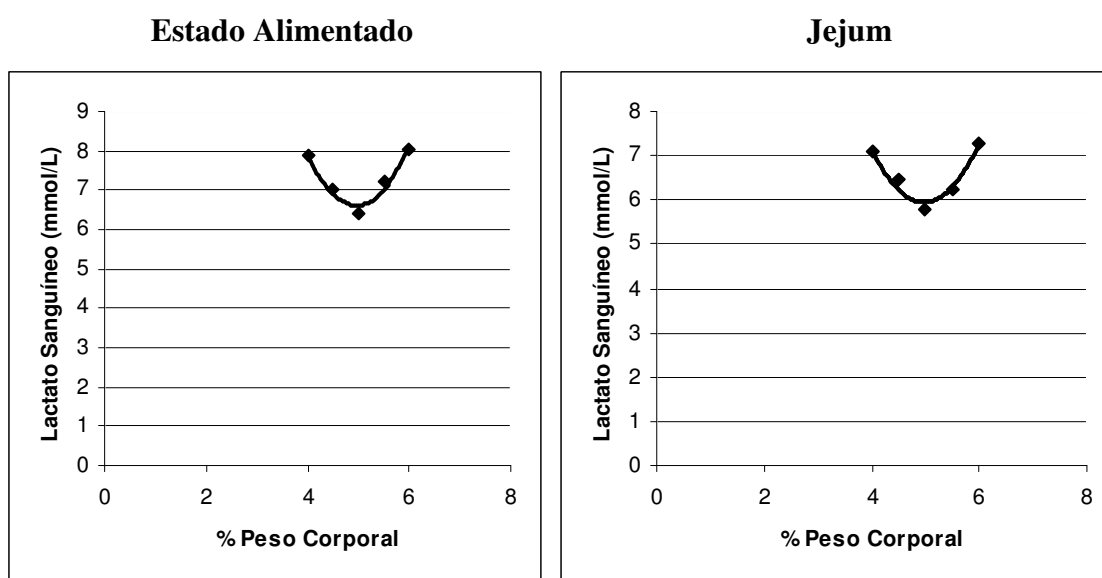


Figura 1: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo de um rato no estado Alimentado e de um rato em Jejum. As curvas foram obtidas por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). As equações a seguir, que definiram as curvas, possibilitaram os cálculos dos menores valores das concentrações de lactato sanguíneo (LS) e respectivas cargas de trabalho (peso corporal – pc). Para estado Alimentado, $y = 1,3886x^2 - 13,794x + 40,866$ (6,61mmol/L de LS à 4,97% do pc); para Jejum, $y = 1,27434x^2 - 12,711x + 36,642$ (5,94mmol/L de LS à 4,99% do pc). Esses menores valores de lactato sanguíneo indicaram as cargas de trabalho equivalentes ao Lan.

Tabela 1: Teores de glicogênio (mg/100mg) no músculo sóleo dos animais nas situações: estado Alimentado, sacrificados após o TLM (A/TLM); estado Alimentado, sacrificados em repouso (A/R); Jejum de 12 horas, sacrificados após o TLM (J/TLM) e Jejum de 12 horas, sacrificados em repouso (J/R).

	A/TLM	A/R	J/TLM	J/R
Média	0,087	0,135	0,048**	0,065*
Desvio Padrão	0,005	0,035	0,003	0,003
n	7	5	7	5

TLM= Teste do Lactato Mínimo

* $p < 0,05$ em relação à situação A/R

** $p < 0,05$ em relação à situação A/TLM

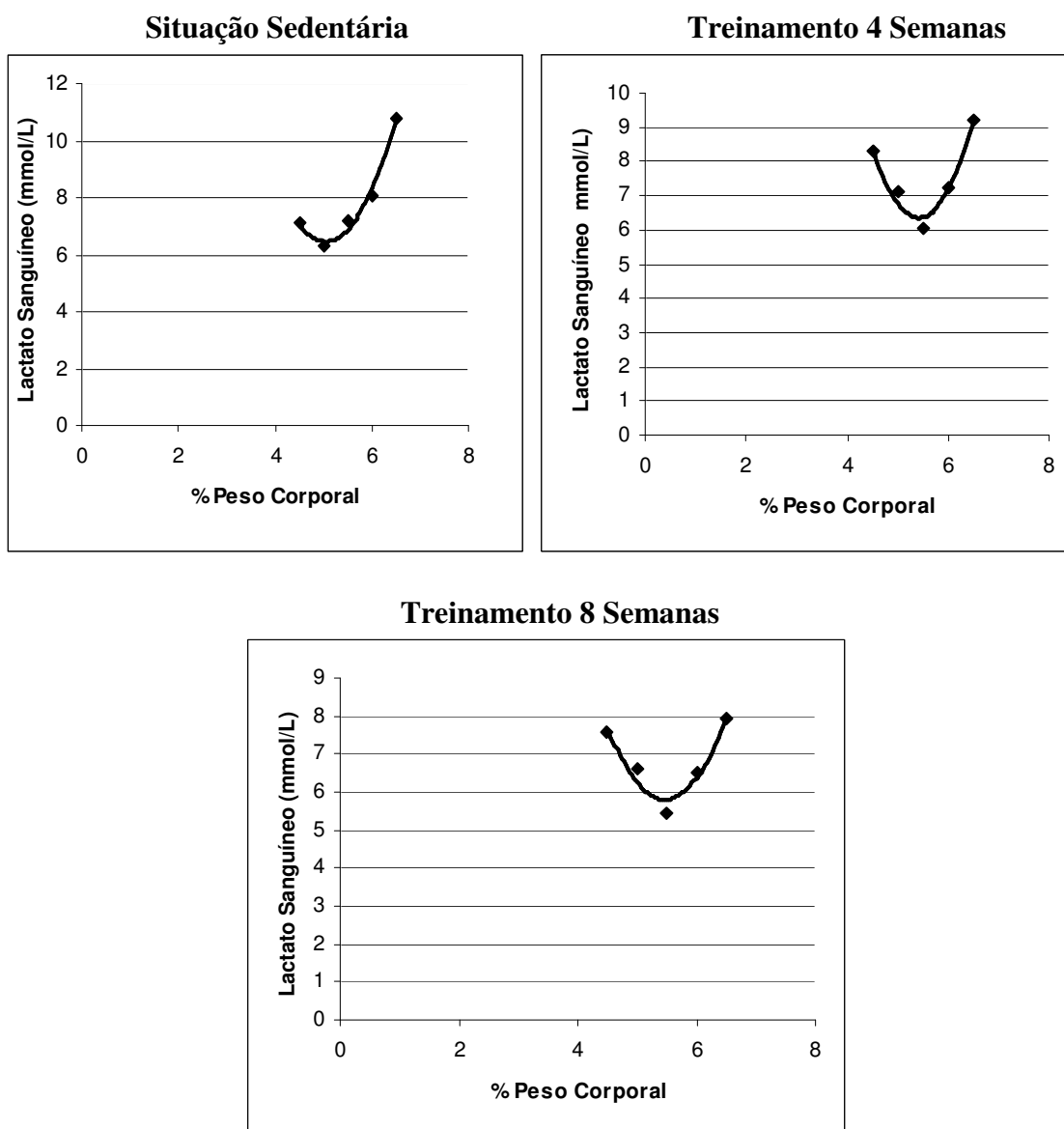


Figura 2: Curvas de lactato sanguíneo vs carga de trabalho de um rato durante testes do lactato mínimo realizados antes (Situação Sedentária) e após 4 ou 8 semanas de treinamento físico de natação suportando carga equivalente ao Limiar Anaeróbico (Lan) individual. As curvas foram obtidas por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). As equações a seguir, que definiram as curvas, possibilitaram o cálculo dos menores valores das concentrações de lactato sanguíneo (LS) e respectivas cargas de trabalho (peso corporal – pc). Para Situação Sedentária, $y = 2,0143x^2 - 20,339x + 57,81$ (5,05% do pc a 6,47 mmol/L de LS); para Treinamento 4 Semanas $y = 2,4343x^2 - 26,405x + 77,958$ (5,41% do pc a 6,32 mmol/L de LS) e para Treinamento 8 Semanas, $y = 2,0229x^2 - 22,119x + 66,266$ (5,97% do pc a 5,80 mmol/L de LS). Esses menores valores de lactato sanguíneo indicam as cargas de trabalho equivalentes ao Lan em cada situação.

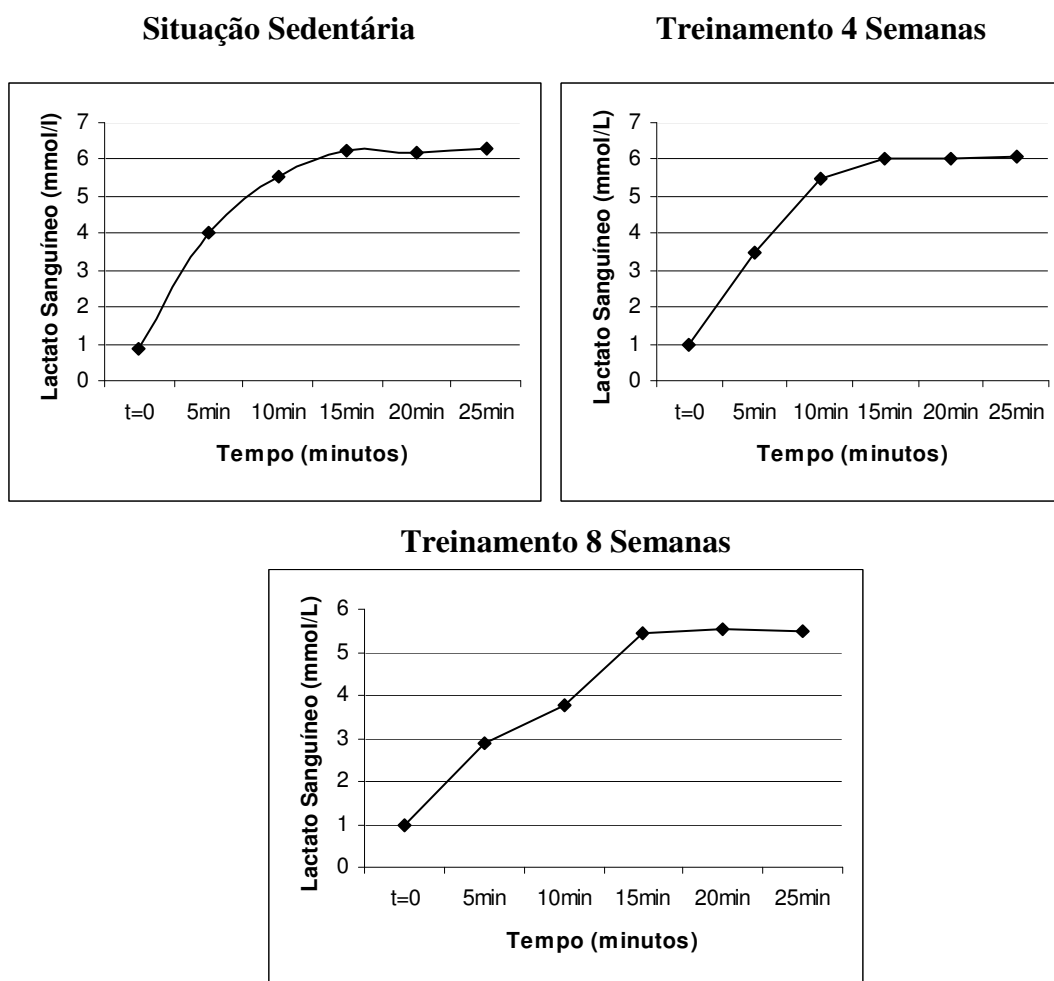


Figura 3: Curva lactato sanguíneo (LS) vs tempo de exercício durante teste de carga fixa de apenas um rato (o mesmo da Figura 3) suportando sobrecarga, em relação ao peso corporal (pc), equivalente ao Limiar Anaeróbio (Lan) individual determinado pelo teste do lactato mínimo, nas situações Sedentária (Lan= 5,05% do pc), Treinamento de 4 Semanas (Lan= 5,41% do pc) e Treinamento de 8 Semanas (Lan= 5,97% do pc). As concentrações de LS do animal estabilizaram-se em $6,25 \pm 0,03$ mmol/L quando em Situação Sedentária; $6,05 \pm 0,03$ mmol/L após 4 semanas de treinamento e em $5,49 \pm 0,04$ mmol/L após 8 semanas de treinamento.

DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras tentativas, as bases fisiológicas para o acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício ainda não foram totalmente elucidadas. Apesar disso, a determinação de “limiares” de lactato, isto é, determinação da intensidade de exercício na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular exponencialmente, tem-se

mostrado ferramenta útil na prescrição de exercícios (SJODIN; JACOBS, 1981; JONES; CARTER, 2000; BILLAT, et al., 2003).

Para fins práticos, o limiar anaeróbio (Lan) tem sido empregado submetendo-se o sujeito a esforços com cargas progressivamente mais elevadas e concomitante avaliação da concentração do lactato sanguíneo. A determinação do Lan pode ser feita baseando-se no desvio da linha de base da concentração circulante de lactato ou na intensidade de trabalho correspondente a uma concentração fixa de lactato circulante. O primeiro método fundamenta-se no fato de que o aumento não linear da concentração de lactato sanguíneo em relação à intensidade do exercício indica a transição do metabolismo, conforme definiram Wasserman e Mc. Ilroy (1964) e KINDERMAN et al. (1979). O segundo procedimento assume o princípio de que até uma determinada concentração circulante de lactato, ocorre um equilíbrio entre a produção muscular e a remoção desse substrato da circulação, conforme postulou Heck et al. (1985).

A determinação do Lan tem-se mostrado, também, valiosa em estudos clínicos (WASSERMAN; Mc ILROY, 1964; NEIVA et al., 1999). Uma vez que existem limitações óbvias nas pesquisas com seres humanos, em especial nos estudos clínicos, modelos animais têm fornecido importantes informações quanto à realização de exercício físico sob diversas condições experimentais, incluindo obesidade (VOLTARELLI et al., 2003), diabetes (LUCIANO; MELLO, 1999), desnutrição (GALDINO et al., 2000) e jejum (STEVANATO et al., 1998).

O presente estudo foi delineado a partir de duas propostas distintas: a) verificar se o Lan determinado pelo teste do lactato mínimo sofre influência da redução dos estoques de glicogênio muscular (induzido por jejum de 12 horas), visto que a

depleção do glicogênio muscular pode reduzir a concentração de lactato sanguíneo em uma dada carga de exercício e b) avaliar a sensibilidade do teste do lactato mínimo às alterações do condicionamento aeróbio decorrentes do treinamento em exercício de natação na carga equivalente ao Lan individual determinada em ratos.

No TLM originalmente descrito para seres humanos (TEGTBUR et al., 1993), a acidose láctica inicial foi induzida em atletas por duas corridas exaustivas consecutivas. A segunda corrida foi seguida por 8 minutos de recuperação (andar lento). Em seguida, foi iniciado o teste progressivo de corrida.

Baseando-se nessas informações, desenvolvemos, em nosso laboratório, um teste para determinar o Lan durante exercício de natação, utilizando os princípios básicos do TLM proposto para seres humanos (TEGTBUR et al., 1993), adaptado às condições do rato (VOLTARELLI et al., 2002). O Lan de ratos, nesse último estudo, foi obtido na carga média calculada de $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal (pc) dos animais na concentração média de lactato sanguíneo (LS) calculada de $7,17 \pm 0,16 \text{ mmol/L}$.

A Figura 1 mostra os valores calculados de intensidade de exercício ($4,97\%$ do pc) e lactato sanguíneo ($6,61 \text{ mmol/L}$), correspondentes ao Lan, de apenas um rato no estado Alimentado do presente estudo. Como se pode notar, a carga de exercício e concentração de lactato sanguíneo, equivalentes ao Lan, obtidos nesse animal, mostraram-se semelhantes aos valores obtidos no estudo anteriormente efetuado com ratos.

Tegtbur et al. (1993) mostram que a depleção dos estoques de glicogênio muscular pode reduzir a concentração de lactato sanguíneo a uma dada carga de exercício durante a realização do TLM por humanos. Os sujeitos deste estudo

(TEGTBUR et al., 1993) realizaram o teste com estoques normais (dieta rica em carboidrato + repouso um dia antes do teste, para assegurar que os estoques de glicogênio muscular não fossem depletados) e reduzidos (dieta pobre em carboidrato + exercício de alta intensidade um dia antes do teste, procedimento no qual a redução dos estoques de glicogênio muscular é esperada – BONEM et al., 1985; GREENHAFF et al., 1988) de glicogênio muscular. Com base nessas informações, submetemos os animais ao jejum de 12 horas, condição que sabidamente depleta os estoques de glicogênio muscular (LI et al., 1993) e os avaliamos quanto ao Lan através do TLM.

Observa-se na Tabela 1, que o jejum de 12 horas mostrou-se eficaz em reduzir, significativamente, os estoques musculares de glicogênio ($0,065 \pm 0,003$ mg/100mg) quando comparados ao estado Alimentado ($0,135 \pm 0,035$ mg/100mg). Portanto, tal procedimento foi eficiente em mimetizar nos animais a condição de redução de estoque de glicogênio muscular proposta no estudo com seres humanos (TEGTBUR et al., 1993).

No estudo realizado por Tegtbur et al. (1993), a carga de trabalho (velocidade de corrida) correspondente ao Lan dos sujeitos de ambos os grupos (dieta rica em carboidrato = 4,7m/s e pobre em CHO = 4,7m/s) não foi modificada quando da realização do TLM. No entanto, a concentração de lactato sanguíneo equivalente ao Lan dos sujeitos, foi obtida em níveis consideravelmente inferiores no grupo que recebeu dieta pobre em carboidrato ($3,1 \pm 1,7$ mmol/L) quando comparada ao grupo que recebeu dieta rica nesse substrato ($3,7 \pm 2,2$ mmol/L), corroborando achados anteriores da literatura (MAASEN; BUSSE, 1989).

No presente estudo com animais, podemos observar (Figura 1) que o comportamento dos resultados, tanto de carga de trabalho quanto de lactato sanguíneo, foi semelhante ao constatado em seres humanos. A carga de trabalho correspondente ao Lan do animal em Jejum (4,99% do pc) foi semelhante à determinada no animal no estado Alimentado (4,97% do pc). No entanto, a concentração de lactato sanguíneo, correspondente ao Lan do animal jejuado (5,94mmol/L) apresentou-se significativamente menor em relação ao valor obtido no animal no estado Alimentado (6,61mmol/l).

O jejum, sabidamente, reduz oxidação de carboidratos, a síntese de glicogênio, e, principalmente, a produção de lactato pelo músculo esquelético (LI et al., 1993). A Tabela 1 contém resultados que suportam a influência dos estoques de glicogênio muscular na concentração de lactato sanguíneo durante o exercício. Podemos observar que os valores médios dos teores de glicogênio obtidos do músculo sóleo dos animais jejuados submetidos ao TLM (n=7; $0,048 \pm 0,003$ mg/100mg) apresentaram-se significativamente menores quando comparados aos valores médios da mesma variável do grupo Alimentado submetido ao TLM (n=7; $0,087 \pm 0,005$ mg/100mg). A menor concentração de lactato sanguíneo durante o teste, apresentada pelos animais jejuados, pode ser consequência da diminuição no conteúdo total de glicogênio do músculo sóleo em relação aos ratos alimentados. Por outro lado, a intensidade (carga de exercício) equivalente ao Lan não foi afetada pela redução dos estoques musculares de glicogênio.

Em outra etapa do presente estudo, o TLM proposto para ratos, foi avaliado quanto à sensibilidade ao treinamento físico aeróbio de natação. Inicialmente, os animais foram submetidos ao TLM para identificação da carga de trabalho (% do pc) e concentração de LS (mmol/L) equivalentes ao Lan dos mesmos. Para ajuste da

intensidade de exercício e verificação dos efeitos do treinamento físico, o TLM foi novamente efetuado após 4 e 8 semanas de treinamento físico de natação.

Como podemos observar na Figura 2, os valores de LS (6,47 mmol/L) e carga de exercício (5,05% do pc), referentes ao Lan individual do animal na situação Sedentária, após o TLM, mostraram-se semelhantes aos obtidos na etapa anterior deste estudo (Figura 1) bem como aqueles obtidos por Voltarelli et al. (2002), evidenciando a reprodutibilidade do teste.

Após 4 semanas de treinamento físico (Figura 2), observou-se melhora nos valores referentes ao Lan individual do animal (5,41% do pc à 6,32 mmol/L de LS) quando comparados com os valores na situação Sedentária e com os valores encontrados em ratos sedentários por Voltarelli et al. (2002). Isso é evidência de evolução no condicionamento aeróbio em função do treinamento físico.

A Figura 2 confirma, também, a sensibilidade do TLM, adaptado às condições do rato, ao treinamento físico de natação. Ao final de 8 semanas de treinamento físico, os valores referentes ao Lan individual do rato (5,97% do pc à 5,80 mmol/L de LS) apresentaram melhora significativa quando comparados com aqueles observados na situação Sedentária, após 4 semanas de treinamento e ainda com os valores obtidos por Voltarelli et al. (2002).

Portanto, podemos afirmar que, no decorrer das etapas de treinamento físico de natação às quais o animal foi submetido, a carga de exercício equivalente ao Lan elevou-se e a concentração de LS diminuiu. Isto é indicativo de melhoria no condicionamento aeróbio. Essa mesma tendência foi obtida nos valores médios calculados para os animais nas situações Sedentária (n=16; $4,93 \pm 0,07$ % do pc à

7,39±0,39 mmol/L de LS), Treinamento por 4 Semanas (n=16; 5,42±0,01 % do pc à 6,38±0,12 mmol/L de LS) e Treinamento por 8 Semanas (n=16; 5,98% do pc à 5,89±0,14 mmol/L de LS).

A Figura 3 contém os valores das concentrações de LS de um rato (mesmo da Figura 2) durante a realização de testes de natação (30 minutos) suportando carga fixa equivalente ao Lan individual do mesmo nas situações Sedentária e após 4 e 8 semanas de treinamento. Estes testes foram efetuados com o intuito de verificar a estabilização do lactato sanguíneo durante exercício realizado na intensidade do Lan, baseando-se no princípio de equilíbrio entre produção e remoção do lactato sanguíneo nessa intensidade de esforço (GOBATTO et al., 2001).

Voltarelli et al. (2002) realizaram o mesmo teste de carga fixa, em ratos eutróficos e sedentários, os quais suportaram sobrecarga equivalente ao Lan determinado pelo TLM e obtiveram estabilização da concentração de LS em 6,41±0,30 mmol/L. Valores semelhantes de carga de exercício e estabilização da concentração de LS (5,05% do pc à 6,25 mmol/L) foram observados no animal na situação Sedentária do presente estudo (Figura 3). Isso sugere que as taxas de produção e remoção do lactato sanguíneo equivaleram-se durante o esforço realizado na intensidade equivalente ao Lan determinado pelo TLM.

Os valores nos quais a concentração de LS estabilizou-se no animal analisado na Figura 3 após 4 e 8 semanas de treinamento (6,05±0,03 mmol/L e 5,49±0,04 mmol/L, respectivamente) foram inferiores à situação Sedentária, atestando melhoria no condicionamento aeróbio com o treinamento.

CONCLUSÃO

- O Lan de ratos submetidos à redução dos estoques de glicogênio muscular foi obtido em carga de exercício (% do peso corporal) semelhante à de ratos controle alimentados. Em contrapartida, a concentração de lactato sanguíneo (mmol/l) na carga de exercício equivalente ao Lan foi menor;
- O padrão de resposta observada nos ratos foi semelhante aquele descrito na literatura para seres humanos, ou seja, a depleção dos estoques de glicogênio muscular não alterou a carga de trabalho equivalente ao Lan, mas reduziu a concentração de lactato sanguíneo, na qual o mesmo apareceu;
- O Lan determinado pelo teste do lactato mínimo foi sensível às modificações do condicionamento físico aeróbio dos animais induzidas pelo treinamento;
- Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo indicam a viabilidade da utilização do teste do lactato mínimo na determinação do limiar anaeróbio de ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLAT, V.L; SIRVENT, P; KORALSZTEIN, J.P; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science (review). **Sports Medicine**. 33(6): 407-426, 2003.

BONEM, A; NESS, G.W; BELCASTRO, A.N; KIRBY, R.L. Mild exercise impedes glycogen repletion in muscle. **Journal of Applied Physiology**. 58: 1622-1629, 1985.

GALDINO, R.S; SOUZA, C.C.A; LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Protein calorie malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to physical exercise. **Nutrition Research**. 20: 257-535, 2000.

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**. 130: 21-27, 2001.

GREENHAFF, P.L; GLEESON, M; MAUGHAN, R.J. Diet-induced metabolic acidosis and the performance of high intensity exercise in man. **European Journal of Applied Physiology**. 57: 583-590, 1988.

HECK, H; A. MADER; G. HESS; S. MUCK and W, HOLLMAN. Justification of the 4,0 mmol/L lactate threshold. **International Journal of Sports Medicine**. 6: 117-130, 1985.

JONES, A. M. and CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Medicine**. 29: 373-376, 2000.

JONES, A. M. and J. H. DOUST. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 Km

running performance. **Medicine and Science of Sports Exercise**. 30: 1304 – 1313, 1998.

KINDERMAN, W; G. SIMON and J, KEUL. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **European Journal of Applied Physiology**. 42: 25-34, 1979.

LI, JING; STILLMAN, J.S; CLORE, J.N; BLACKARD, W.G. Skeletal muscle lipids and glycogen mask substrate competition (Randle cycle). **Metabolism**. 42 (4): 451-456, 1993.

LO, S; RUSSEL, J.C; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**. 28 (2): 234-236, 1970.

LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteína em músculos de ratos diabéticos. **Revista Paulista de Educação Física**. 12: 202-209, 1999.

MAASSEN, N; BUSSE, M.W. The relationship between lactic acid and work load – a measure for endurance capacity or an indicator of carbohydrate deficiency? **European Journal of Applied Physiology**. 58: 728-737, 1989.

NEIVA, C.M; BUNC, V; MELLO, M. Glicemia, insulinemia e trigliceridemia de ratos diabéticos experimentais e alimentados com dieta hiperlipídica, submetidos a

treinamento físico por aeróbio e anaeróbio. **Revista Científica da Universidade de Franca**- 201-210, 1999.

RIBIERO, L; BALIKIAN, P; MALACHIAS, P; BALDISSERA, V. Stage length, spline function and lactate minimum swimming speed. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**. 43 (3): 312-318, 2003.

SJODIN, B. and I, JACOBS. On set of blood lactate accumulation and marathon running performance. **International Journal of Sports Medicine**. 2: 23-26, 1981.

STEVANATO, E; GOBATTO, C.A; SIBUYA, C.Y; MELLO, M.A.R; KOKUBUN, E. Free fatty acid concentration did not affect carbohydrate metabolism in soleus muscle in vitro. **Medicine and Science of Sports and Exercise**. 30(5): S247-S247. 1998.

TEGTBUR, U; M. W. BUSSE and K. M. BRAUMANN. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise . **Medicine and Science of Sports Exercise**. 25: (5): 620-627, 1993.

VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35: 1389-1394, 2002.

VOLTARELLI, F.A; NUNES, W.M.S; SANTHIAGO, V; PAULI, J.R; GARCIA, D.R; ROMERO, C.E.M; SILVA, A.S; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determinação do

Limiar Anaeróbio em Ratas Obesas com Glutamato Monossódico (MSG). **Revista Logos**. (11): 84-93, 2003.

WASSERMAN, K. and M. B. MC. ILROY. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **American Journal of Cardiology**. 14: 844-852, 1964.

CAPÍTULO 3

VOLTARELLI, F.A; NUNES, W.M.S; SILVA, A.S.R; ROMERO, C.E.M; GARCIA, D.R; PAULI, J.R; SANTHIAGO, V; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determinação do limiar anaeróbio em ratas obesas tratadas com glutamato monossódico (MSG). **Revista Logos**. 11: 84-92, 2003.

RESUMO

Limiar Anaeróbio (Lan) é considerado um bom indicador do condicionamento aeróbio. Faltam na literatura informações quanto ao Lan de ratos obesos. Esse estudo visou determinar o Lan de ratas Wistar obesas por tratamento com MSG através do teste do lactato mínimo (TLM) em exercício de natação, adaptado ao rato. A curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho obtido no teste foi ajustada (ajuste polinomial de grau 2) com auxílio de programa de computador (EXCELL[®]), sendo a carga de trabalho equivalente ao Lan e respectiva lactacidemia, calculadas. O grupo MSG mostrou maior porcentagem de gordura na carcaça ($39,3 \pm 3,3$) do que o controle ($17,3 \pm 1,8$), provando a eficácia da droga na produção da obesidade. O Lan médio calculado para o grupo MSG foi obtido na carga de $4,90\% \pm 0,24$ do peso corporal (pc) a $5,01 \pm 0,27$ mmol/L de lactato sanguíneo. O Lan médio calculado para o grupo Controle foi obtido na carga de $5,10\% \pm 0,51$ do pc a $7,06 \pm 0,42$ mmol/L de lactato

sanguíneo. Em outra série de experimentos, onde os animais nadaram suportando carga fixa equivalente ao Lan, constatou-se que após 10 minutos de exercício, o lactato sanguíneo estabilizou-se em ambos os grupos. Foram observados valores médios menores (mmol/L) no grupo MSG ($5,22 \pm 0,02$) que no Controle ($6,58 \pm 0,03$), sugerindo menor intensidade de esforço para os primeiros. Isso pode ser devido à menor densidade corporal (g/mL) mostrado pelo grupo MSG ($0,90 \pm 0,23$) em relação ao Controle ($0,93 \pm 0,24$), o que facilitaria a flutuação. Esses resultados indicam a importância da adequada identificação da intensidade de esforço representada pela carga que o animal suporta durante o exercício, para que se possa desenvolver protocolos de treinamento adequados a ratos obesos.

Palavras-chaves: limiar anaeróbio, glutamato monossódico, obesidade, ratos, natação.

ABSTRACT

Anaerobic Threshold (AT) is considered to be a good indicator of aerobic fitness. The literature lacks information on AT in obese rats. This study aimed the determination the AT of MSG obese Wistar rats through the minimum lactate test (MLT) adapted to the rat during swimming exercise. Blood lactate vs workload curve obtained during the test was fitted with aid of a computer program (EXCELL[®]) and the workload corresponding to the AT was calculated by grade 2 polynomial equation. The MSG-group showed higher carcass fat percentage (39.3 ± 3.3) when compared to the control group (17.3 ± 1.8). The mean calculated AT for the MSG-group was 4.90 ± 0.24 % of body weight (bw), at a 5.01 ± 0.27 mmol/L blood lactate. The mean calculated AT for the control group was $5.10\% \pm 0.51$ bw at a 7.06 ± 0.42 mmol/L blood lactate. In

another set of experiments, in which the animals swam 20 min supporting a load equivalent to the AT, blood lactate concentration stabilized after 10 min of exercise for both groups. However, the mean values (mmol/L) observed were lower in the MSG (5.22 ± 0.02) than in the control (6.58 ± 0.03) group, suggesting an effort effect intensity for the first group. This may be due to the lower body density (g/ml) observed in MSG (0.90 ± 0.23) than in control (0.93 ± 0.24) rats. Taken together these results indicate the importance of the proper identification of the effort intensity represented by the load supported by the animals for the development of exercise training protocols adapted to obese rats.

Key Words: anaerobic threshold, monosodium glutamate, obesity, rats, swimming.

INTRODUÇÃO

Limiar anaeróbio (Lan) pode ser definido como a carga de trabalho na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular exponencialmente durante exercícios progressivos (MADER; HECK, 1986) e tem sido considerado bom indicador do condicionamento aeróbio em atletas.

Por razões óbvias, grande número de pesquisas envolvendo exercício físico tem sido realizadas em animais de laboratório, especialmente o rato, e as concentrações sanguíneas de lactato, utilizadas para a determinação da intensidade do esforço. Uma vez que existem diferenças metabólicas entre seres humanos e ratos, é razoável supor que haja, também, diferenças entre espécies com respeito ao fluxo ou cinética de lactato. Os protocolos de exercício físico para ratos mais empregados utilizam, como ergômetro, a corrida em esteira rolante e a natação. Em protocolos de natação para ratos, exercício progressivo pode ser obtido pela adição de sobrecargas

progressivamente mais pesadas em relação ao peso corporal, atadas ao tórax do animal (GOBATTO et al., 1991).

Tegtbur et al. (1993), desenvolveram protocolos para determinação do Lan em humanos baseados no princípio de que, durante testes de exercícios com cargas progressivas realizadas imediatamente após uma sessão de exercício máximo, o lactato sanguíneo inicialmente declina para um valor mínimo para, em seguida, aumentar novamente. Esses autores definiram como lactato mínimo a intensidade de exercício no qual a curva em forma de “U” derivada dos valores de lactato sanguíneo obtidos durante o teste progressivo atinge o nadir. Esse valor mínimo indica o Lan.

Com base nessas informações, Voltarelli et al. (2002) desenvolveram um teste para determinar o Lan durante exercício de natação, utilizando os princípios básicos do teste de lactato mínimo proposto por Tegtbur et al. (1993), adaptado às condições do rato. O Lan, no estudo de Voltarelli et al. (2002), foi obtido na carga de $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal do animal na concentração de lactato sanguíneo interpolada equivalente a $7,17 \pm 0,16$ mmol/L.

A determinação do Lan tem-se mostrado, útil em estudos clínicos envolvendo a obesidade (NEIVA et al., 1999). Uma vez que existem limitações nas pesquisas com seres humanos, especialmente nos estudos clínicos, modelos animais têm fornecido informações sobre doença que não poderiam ser obtidas de outra forma (SCALFANI et al., 1988). Assim os estudos dos efeitos do exercício em modelos animais de obesidade podem contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

Por outro lado, a incidência de obesidade vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas, tornando-se um dos grandes problemas atuais

de saúde pública mundial, e vem sendo considerada como a “doença do século”. A obesidade é consequência de um desequilíbrio no balanço entre a energia ingerida e a gasta para manutenção de processos vitais, levando ao acúmulo de gordura corporal. A mesma pode ser desencadeada quando há excesso na ingestão, sem um aumento correspondente no gasto de energia, ou quando, mesmo com ingestão adequada, ocorrem erros no metabolismo e na utilização de substratos (REIMER, 1992). Pode-se considerar que a obesidade seja uma condição onde há excesso de gordura corporal, localizada ou generalizada e que, geralmente, resulta em outros danos à saúde, como problemas cardiovasculares, endócrinos, redução da expectativa de vida, certos tipos de câncer entre outros (BJORNTORP, 1990; REYBROUK et al., 1987). O exercício físico, por sua vez, tem sido empregado isoladamente ou em associação com dieta de restrição calórica, para desencadear perda de peso (IVY et al., 1999).

Vários modelos de obesidade animal têm sido analisados e já foram classificados pela sua etiologia. Entre os modelos neurais, a obesidade hipotalâmica é a mais conhecida (SCALFANI, 1984). Há várias maneiras de indução da obesidade hipotalâmica, incluindo as injeções sistêmicas de glutamato monossódico (MSG) (MARMO et al., 1994; MELLO et al., 2001). O MSG é um aminoácido neuroexcitatório lesivo ao sistema nervoso central quando em quantidades excessivas, pois danifica núcleos pertencentes ao hipotálamo, ou seja, provoca alterações no eixo hipotálamo-hipofisário (ROHNER, 1995). Em função disso, a taxa metabólica basal dos animais tratados com MSG decresce, favorecendo a instalação da obesidade (TOKUYAMA; HIMMS-HAGEN, 1986; ANDRADE, 1995). Embora existam relatos na literatura acerca de adaptações metabólicas ao exercício de ratos obesos pelo tratamento com MSG (MELLO et al., 2001), o Lan desses animais ainda não foi

determinado. Portanto, o presente estudo visou determinar o Lan de ratas obesas pelo tratamento com MSG durante a realização de exercício de natação com cargas progressivas, baseadas no teste do lactato mínimo.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar recém nascidas, cujas mães eram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP. Após o desmame os animais permaneceram em gaiolas coletivas (5 ratas por gaiola), foram alimentados com ração comercial (Purina®) para roedores e água *ad libitum* bem como mantidos sob ciclo periódico claro e escuro de 12 horas à temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Grupos Experimentais

Ao nascimento, parte das ratas (n=8) recebeu injeção subcutânea de Glutamato monossódico (MSG) na dose de 4 mg/g de peso corporal, em dias alternados, até completarem 14 dias de vida. Como controle foram usadas ratas que receberam, ao nascimento, solução salina (NaCl 0,9%) (n=8).

Adaptação ao Meio Líquido

Após completarem 4 meses de vida e antes da realização do teste de lactato mínimo, todas as ratas foram submetidas à adaptação ao meio líquido. A adaptação consistiu em manter o animal em contato com água rasa à temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ (VOLTARELLI et al., 2002), durante 3 semanas, 5 dias por semana por 30

minutos. Nas 2^a e 3^a semanas de adaptação, os mesmos suportaram sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água.

Teste do lactato mínimo (TLM) para determinação do limiar anaeróbio (Lan)

Foi utilizado o TLM descrito por Tegbur et al. (1993), adaptado às condições do rato por Voltarelli et al. (2002). As ratas, de ambos os grupos, foram submetidas à natação suportando carga de 30% do peso corporal durante 6 minutos (30s de exercício, interrompidos por 30s de repouso). Após intervalo de 9 minutos, os animais realizaram exercício de natação em tanques (100x80x80cm) com cargas progressivamente maiores em relação ao peso corporal (4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5% e 6%) com duração de 5 minutos em cada carga. Antes do início do teste (repouso) e a cada troca de carga, foram coletadas amostras de sangue (25 µL) para a determinação do lactato. A curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho, para cada rata obtido no teste, foi obtida por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de um programa de computador (MICROSOFT EXCEL®). Procedeu-se, então, a determinação matemática, pela análise da função, do menor valor da concentração de lactato sanguíneo e respectiva carga de trabalho. Esse menor valor indicou o Lan individual.

Exercício agudo com carga fixa equivalente ao Lan

Em outra serie de testes ocorrida 48 horas após o TLM, 4 ratas de cada grupo foram submetidas ao exercício de natação, suportando carga fixa equivalente ao Lan individual durante 20 minutos. Foram coletadas amostras em situação de repouso e

a cada 5 minutos de exercício, para a determinação do lactato (Analisador Eletroquímico YSL modelo 1500 SPORT, Yellow Spring, OH, USA).

Avaliações realizadas na condição de repouso antes do sacrifício

Densidade Corporal

Para a determinação da densidade corporal, todos os animais foram submersos em proveta de vidro (1000ml) contendo 400 ml de água destilada, visando o registro do deslocamento da coluna de água. As quatro patas foram imobilizadas com fita adesiva, e uma carga correspondente a 25% do peso corporal foi atada à cauda antes da imersão.

Índice de Lee

Foi calculado para todos os animais dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal em grama pelo comprimento focinho-ânus em centímetros e multiplicando-se por 10 (BERNARDIS; PETERSON, 1968). Este índice, proposto para animais experimentais, equivale ao índice de massa corporal (IMC) para seres humanos.

Avaliações realizadas na condição de repouso após o sacrifício

Lipídios Totais da Carcaça

Quatro animais de cada grupo foram sacrificados, em repouso, 72 horas após o exercício agudo com carga equivalente ao Lan. Após o sacrifício, os animais foram desviscerados, a carcaça foi pesada, desidratada em estufa à temperatura de 100°C e novamente pesada para determinar o peso seco. Posteriormente, a carcaça seca foi homogeneizada com auxílio de um liquidificador, e lavada com éter de petróleo por

3 vezes, para a extração da gordura. Foi novamente colocada em estufa a 100°C para secagem. O conteúdo de gordura foi calculado pela diferença entre o peso seco antes e depois do tratamento com éter de petróleo (MELLO et al., 2001).

DNA do Tecido Adiposo Perirrenal

O teor de DNA do tecido adiposo perirrenal foi determinado pelo método de dosagem descrito por Giles e Meyer (1965). O número e o tamanho da célula nesse tecido foram inferidos, através dos teores de DNA e da razão peso total do tecido /DNA respectivamente (WINICK; NOBLE, 1965).

Avaliação realizada imediatamente após a sessão de exercício na carga equivalente ao Lan individual e sacrifício

Glicogênio Tecidual

Imediatamente após a realização do exercício com carga fixa equivalente ao Lan, os animais foram decapitados e exanguinados. Alíquotas de tecido hepático, músculo sóleo e gastrocnêmio foram separadas para determinação do glicogênio pelo método colorimétrico com fenol e ácido sulfúrico (LO S et al., 1970).

Análise Estatística

Os dados foram expressos como MÉDIA \pm Erro Padrão. Foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) seguida de BONFERRONI. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

As figuras 1 e 2 mostram os valores do Lan calculados, através da equação polinomial de grau 2 que definiu a curva lactato sanguíneo (mmol/L) vs carga de trabalho (% peso corporal), para uma rata de cada grupo durante o TLM de natação. O Lan calculado do animal do grupo MSG foi obtido na carga de 4,96% do peso corporal, na concentração de 5,05 mmol/L de lactato sanguíneo. Em relação ao grupo Controle, o Lan calculado para o animal ocorreu na carga de 5,26% do peso corporal à uma concentração de 7,20 mmol/L de lactato sanguíneo.

Os valores médios do Lan calculados para os grupos MSG (n=8) e Controle (n=8) foram de $4,90 \pm 0,24$ e $5,01 \pm 0,27\%$ de carga em relação ao peso corporal, nas concentrações de $5,10 \pm 0,51$ e $7,06 \pm 0,42$ mmol/L de lactato sanguíneo, respectivamente.

A figura 3 refere-se aos valores médios de lactato sanguíneo (mmol/L) durante teste de exercício agudo de natação na carga equivalente ao Lan individual determinado no TLM para os animais pertencentes aos grupos MSG (n=8) e Controle (n=8). Após 10 minutos de exercício, as concentrações do substrato (mmol/L) estabilizaram-se tanto no grupo controle ($6,58 \pm 0,03$) quanto no MSG ($5,22 \pm 0,02$). Contudo, os valores do último grupo foram significativamente inferiores aos do primeiro.

A Tabela 1 mostra os valores de glicogênio tecidual obtidos nos grupos Controle (n=4) e MSG (n=4), imediatamente após sessão de exercício na intensidade equivalente ao Lan. As concentrações de glicogênio do músculo sóleo do grupo MSG foram significativamente maiores em relação ao grupo Controle. A Tabela 2 mostra os valores dos parâmetros gerais avaliados na condição de repouso. No que se refere à

porcentagem de gordura na carcaça e ao peso do tecido adiposo perirrenal, o grupo MSG (n=4) apresentou valores significativamente maiores comparado com o grupo Controle (n=4). O índice de Lee do grupo MSG (n=8) mostrou-se significativamente superior ao do grupo Controle (n=8). Quanto aos valores da densidade corporal, o grupo MSG (n=8) apresentou menores valores em relação ao grupo Controle (n=8).

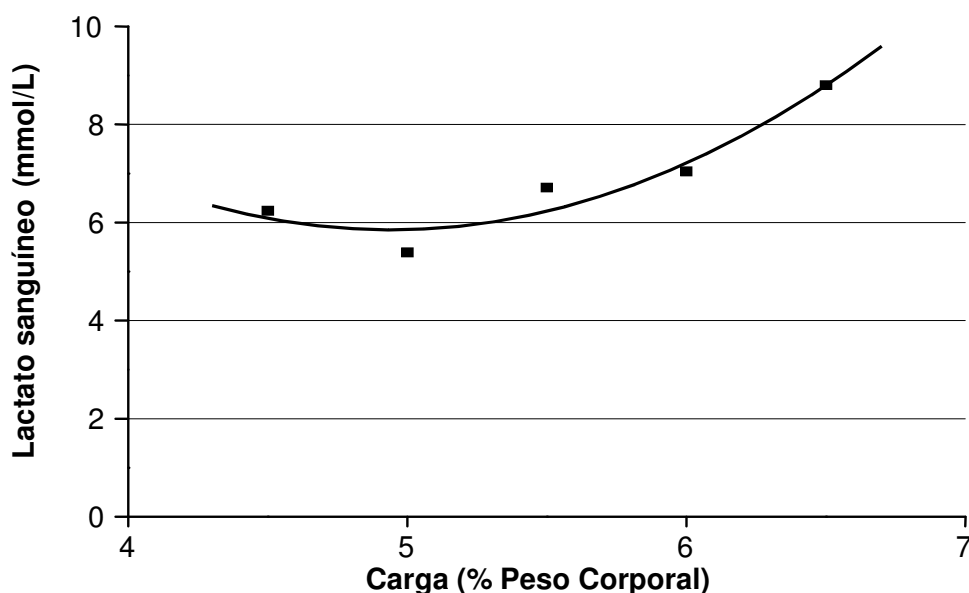


Figura 1: Curva Lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste de lactato mínimo de um rato do grupo obeso (MSG). A curva foi ajustada por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de programa de computador (EXCELL®). A equação $Y = 1,417x^2 - 14,06x + 39,932$, que define a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo (5,05 mmol/L) e respectiva carga de trabalho (4,96%). Esse menor valor de lactato sanguíneo indica a carga de trabalho equivalente ao Lan.

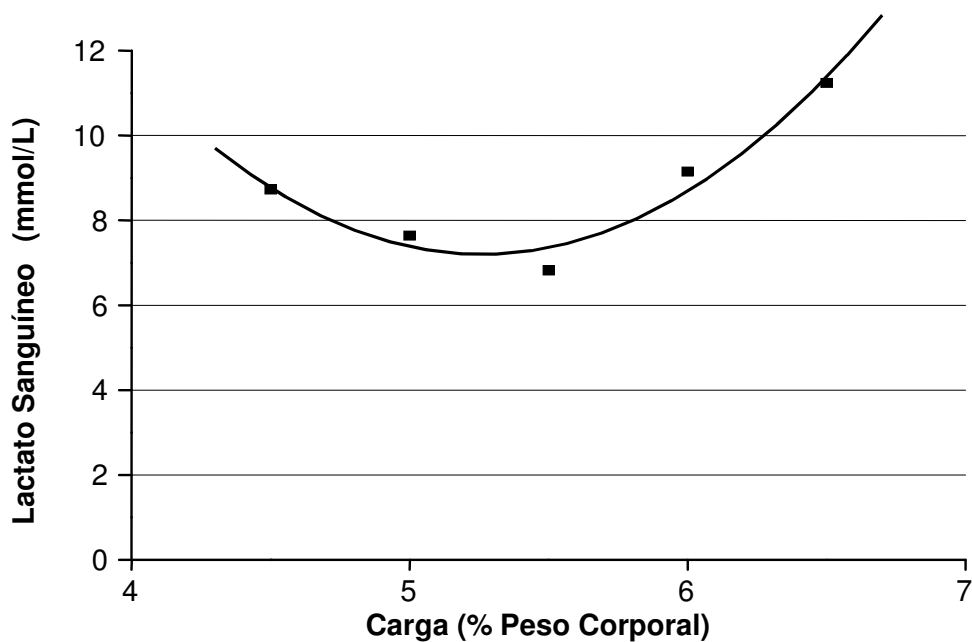


Figura 2: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste de lactato mínimo de um rato do grupo controle. A curva foi ajustada por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de programa de computador (EXCELL®). A equação $y = 2,7171x^2 - 28,583x + 82,368$, que define a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo (7,20 mmol/L) e respectiva carga de trabalho (5,26%). Esse menor valor de lactato sanguíneo indica a carga de trabalho equivalente ao Lan.

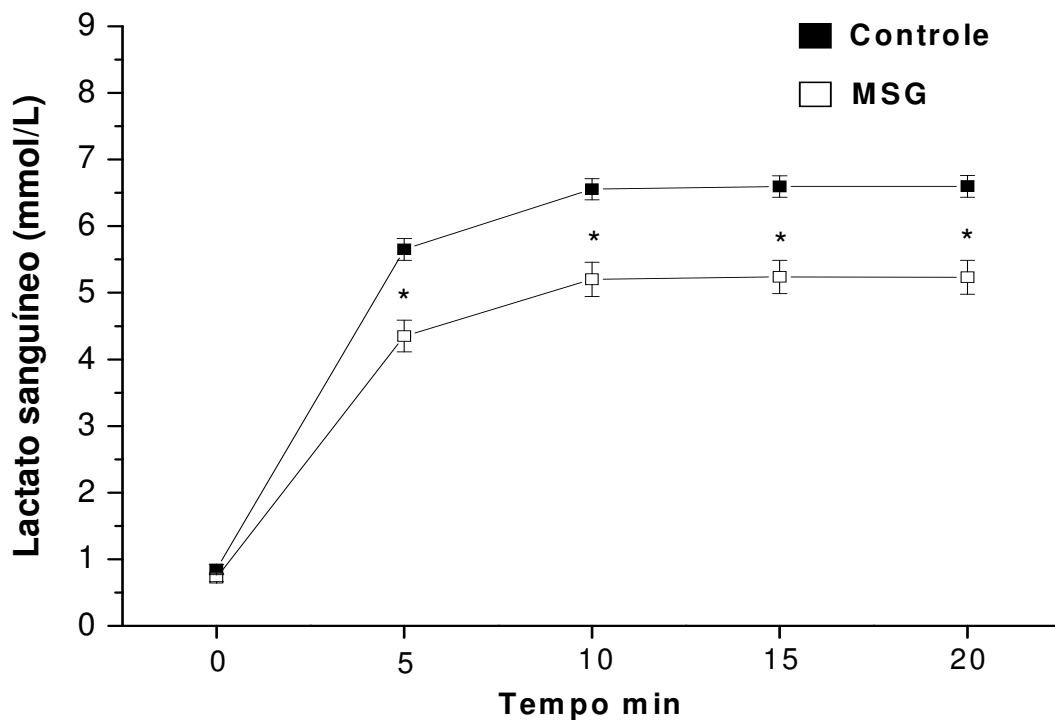


Figura 3: Cinética de lactato sanguíneo (mmol/L) em ratos dos grupos MSG (n=8) e Controle (n=8) durante teste de natação suportando carga fixa equivalente ao limiar anaeróbico, determinado no teste de lactato mínimo. Os valores estão expressos em Média \pm Erro Padrão de cada grupo. *Diferença Significativa ($p < 0,05$, ANOVA) em relação ao grupo Controle.

Tabela 1: Glicogênio tecidual (mg/100mg) medido nos animais imediatamente após sessão única de exercício na carga equivalente ao Lan individual.

	Controle	Obeso (MSG)
Glicogênio Hepático	2,79 \pm 0,86	4,35 \pm 1,19
Glicogênio no Músculo Sóleo	0,66 \pm 0,02	0,86 \pm 0,03*
Glicogênio no Músculo Gastrocnêmio	0,12 \pm 0,01	0,12 \pm 0,09

Os dados são expressos em Média \pm Erro Padrão; n=4/grupo (*) diferença em relação ao Controle ($p < 0,05$).

Tabela 2: Parâmetros gerais medidos nos grupos Controle e Obeso (MSG) na condição de repouso.

	Controle	Obeso (MSG)
Peso do Tecido Adiposo Perirrenal (g) (n=4)	3,54 ± 1,01	13,15 ± 3,21*
DNA do Tecido Adiposo (mg/100mg) (n=4)	0,037 ± 0,01	0,039 ± 0,004
Razão Peso/DNA no Tecido Adiposo (n=4)	115,4 ± 48,05	360,25 ± 123,37
Lipídios Totais na Carcaça (%) (n=4)	17,3 ± 1,80	39,3 ± 3,33*
Índice de Lee (n=8)	310,29 ± 4,07	351,14 ± 8,44*
Densidade (g/ml) (n=8)	0,93 ± 2,39	0,90±2,29*

Os dados são expressos em Média ± Erro Padrão

(*) diferença em relação ao Controle ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Atualmente, vem aumentando consideravelmente a incidência mundial da obesidade. Esta condição preocupante tornou-se um grande problema de saúde pública a ser resolvido. Os americanos possuem o maior consumo per capita de gordura do mundo (KATCH; MCARDLE, 1993). Dados do National Center for Health Statistics de 1981, referido por Lardy e Sahago (1990), descrevem que um quarto da população adulta dos Estados Unidos da América possuía peso corporal em torno de 20% acima do peso normal. A quantidade de crianças obesas, desde então, tem aumentado rapidamente. Dados do plano Nacional de Saúde e Nutrição de 1989 verificou que em 7% dos meninos e 9% das meninas brasileiras havia incidência de obesidade. O aumento da quantidade de crianças obesas em todo o mundo está associado a fatores de risco cardíaco e também, com o passar do tempo, levarão estes indivíduos a manifestar doenças crônicas como hiperlipidemia, hiperinsulinemia, hipertensão e aterosclerose

(BERENSON et al., 1993; BERENSON et al., 1998). Dessa forma, estudos envolvendo a obesidade, quer clínicos, quer em modelos experimentais, tornam-se de grande valia.

No presente estudo optou-se pela análise no modelo experimental de obesidade provocada pelo tratamento com glutamato monossódico (MSG) em ratos. O MSG é um aminoácido neuro-excitatório lesivo ao sistema nervoso central porque danifica núcleos pertencentes ao hipotálamo (ROHNER, 1995). O processo lesivo do MSG ocorre a partir do aumento prolongado nas condutâncias iônicas da membrana, alterando o potencial de repouso normal. Na tentativa de restaurar os gradientes iônicos e osmóticos, a célula esgota os estoques energéticos, levando-a à morte celular (COYLE et al., 1981).

O hormônio do crescimento (GH) é, provavelmente, o hormônio hipofisário mais afetado pelo tratamento com MSG. Como o GH é um hormônio calorigênico, que normalmente produz lipólise e anabolismo, sua deficiência acarretaria falha na mobilização das gorduras e intolerância ao frio, contribuindo para o aumento do tecido gorduroso destes animais (REMKER et al., 1988).

Um fator que está relacionado à gênese da obesidade no modelo MSG é a diminuição da taxa do metabolismo basal (TOKUYAMA; HIMMS-HAGEN, 1986). Marmo et al. (1994) verificaram que a massa do tecido adiposo de ratos tratados com MSG aumentava a partir do 28º dia de tratamento, apesar de características normofágicas ou hipofágicas apresentadas nos ratos.

Pode-se observar na tabela 1 que ratas obesas tratadas com MSG obtiveram um aumento significativo no peso da gordura perirrenal em relação ao grupo controle. Outro parâmetro analisado foi o percentual de gordura da carcaça dos dois grupos experimentais, onde os resultados mostram que as ratas MSG mostraram valores

significativamente maiores do que as controle. Estes dados confirmam a eficiência da droga em produzir quadro de obesidade em roedores, conforme descrito anteriormente por Coscina et al. (1985). No presente estudo foi calculado o “Índice de Lee”. Já foi relatada anteriormente excelente correlação da gordura corporal com o “Índice de Lee”, tanto na fase adulta, como na fase de desmame em animais, induzidos à obesidade, devido à lesão hipotalâmica (BERNARDIS et al., 1968) e também uma correlação satisfatória com o tecido gorduroso perirrenal (COSCINA et al., 1985). Os resultados referentes ao “Índice de Lee” do presente estudo reforçam a eficiência da droga e a adequação desse índice para a identificação da obesidade induzida pelo MSG em ratos.

Como se sabe, a obesidade é uma patologia que pode ser diagnosticada, evitada e tratada através de várias maneiras, incluindo: reeducação alimentar, cirurgias para redução do estômago e a prática de atividade física.

As diferenças entre vários modelos de obesidade animal indicam que nenhum deles, isoladamente, serve como modelo geral da condição humana e que poucos representam aproximadamente os tipos de obesidade humana existente (SCALFANI, 1984). Por isso, no que diz respeito a protocolos de exercício para esses animais, torna-se importante o conhecimento da intensidade de exercício a ser empregada para que o treinamento seja apropriado.

No presente estudo, foi adotado o teste do lactato mínimo (TLM) (TEGEBUR et al., 1993), adaptado às condições do rato (VOLTARELLI et al., 2002), para a determinação do limiar anaeróbio (Lan) dos animais pertencentes aos grupos Controle e Obeso. Esse teste baseia-se no princípio de que durante testes de exercícios com cargas progressivas, realizadas imediatamente após uma sessão de exercício

máximo, o lactato sanguíneo inicialmente declina para um valor mínimo para, em seguida, aumentar novamente. Esse valor mínimo indica o Lan.

Voltarelli et al. (2002) determinaram o Lan de ratos sedentários eutróficos através do TLM durante exercício de natação. Os valores médios calculados referentes ao Lan desses animais foram equivalentes a $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal a uma concentração de $7,17 \pm 0,16$ mmol/L de lactato sanguíneo. Esses resultados sugerem a aplicação desse teste na determinação do Lan em estudos animais, relacionados durante o exercício. A intensidade de exercício e a concentração do lactato correspondentes ao Lan de animais sedentários obesos tratados com MSG ainda não foram determinados e, por essa razão, foi o foco principal de nosso estudo.

Os valores calculados de lactato sanguíneo e carga equivalente ao Lan de uma rata do grupo Controle foram determinados pelo TLM. Os valores ($5,26\%$ do peso corporal a $7,20$ mmol/L de lactato sanguíneo) mostraram-se semelhantes aos obtidos por Voltarelli et al. (2002). O mesmo ocorreu com os valores médios calculados para o grupo todo ($5,01 \pm 0,27\%$ do peso corporal a $7,06 \pm 0,42$ mmol/L de lactato sanguíneo) desse mesmo grupo (n=8).

Como se pode observar na Figura 1, a carga equivalente ao Lan, determinada em uma rata obesa ($4,96\%$ do peso corporal), mostrou-se semelhante à obtida por Voltarelli et al. (2002). No entanto, o valor de lactato sanguíneo ($5,05$ mmol/L) apresentou-se reduzido quando comparado com esse mesmo estudo. O mesmo foi observado nos valores médios interpolados ($4,90 \pm 0,24\%$ do peso corporal a uma concentração de $5,10 \pm 0,51$ mmol/L de lactato sanguíneo) desse mesmo grupo (n=8).

Em outra série de testes, tanto as ratas do grupo Controle (n=8) quanto as do grupo MSG (n=8) realizaram exercício agudo suportando sobrecarga fixa

equivalente ao Lan determinado no TLM durante exercício de natação. Após 10 min de exercício, as concentrações de lactato sanguíneo estabilizaram-se em ambos os grupos (Figura 3). Os valores do grupo Controle ($6,58 \pm 0,03$ mmol/L) foram superiores ao do grupo MSG ($5,22 \pm 0,02$ mmol/L). Em estudo recente, Voltarelli et al. (2002) realizaram esse mesmo protocolo em ratos sedentários normais e o valor obtido ($6,41 \pm 0,30$ mmol/L) foi semelhante ao encontrado no grupo Controle do presente estudo. Além disso, pode-se observar que as taxas de glicogênio do músculo sóleo imediatamente após o mesmo exercício (Tabela 1), mostraram-se significativamente maiores no grupo MSG ($0,86 \pm 0,03$ mg/100m) do que no grupo Controle ($0,66 \pm 0,02$ mg/100mg). A análise conjunta dos valores de lactato sanguíneo e glicogênio muscular sugere menor intensidade de esforço para o grupo MSG do que para o Controle na mesma carga de trabalho. Há uma explicação para tal fenômeno, que pode ser evidenciada pela medida da densidade corporal dos animais. O grupo MSG apresentou densidade significativamente menor do que o grupo Controle. Isso pode facilitar a flutuação na natação, implicando em redução na intensidade de esforço.

CONCLUSÃO

- O teste de lactato mínimo em exercício de natação empregado permitiu a determinação do Lan em ratas obesas pelo tratamento com MSG.
- As ratas obesas apresentaram menores taxas de depleção dos estoques de glicogênio muscular após o exercício que as controle.
- Os resultados sugerem menor intensidade de esforço para uma mesma carga de trabalho para os animais obesos que para os controles.

- Tais resultados evidenciam a importância da identificação apropriada da intensidade de esforço que representa a carga que o animal suporta durante o exercício, para que se possa desenvolver protocolos de treinamento adequados a ratos obesos. Isso pode ser facilmente obtido a partir da análise da lactacidemia durante exercícios com cargas progressivas, tais como o teste de lactato mínimo.

BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, I.S. Efeito da adrenalectomia e ingestão de sacarose sobre o metabolismo e comportamento alimentar, em ratos normais e obesos, pelo tratamento com glutamato monossódico. **Dissertação-Mestrado-UNIFESP**. São Paulo, 78p, 1995.

BERENSON, G.S, SRINIVASAN, S.R, WATTIGNEY, W.A; HARSHA, D.W. Obesity and cardiovascular risk in children. **Annual NY Academic Science**. 699: 93-103, 1993.

BERENSON, G.S; SRINIVASAN, S.R; BAO, W; NEWMAN, W.P; TRACY, R.E; WATTIGNEY, W.A. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. **New England Journal Medicine**. 338: 1650-6,1998.

BERNARDIS, L.L.; PETTERSON B.D. Correlation between “Lee Index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**. 40(4): 527-528, 1968.

BJORNTORP, P. Adipose tissue adaptation to exercise. **Exercise, Fitness and Health**. 315-323, 1990.

COSCINA, D.V; CHAMBERS, J.W; PARK, I; HOGAN, S; HIMMS-HAGEN, J. Impaired diet-induced thermogenesis in brown adipose tissue from rats made obese with parasagittal hypothalamic knife-cuts. **Brain Research Bull**. 14(6): 585-593, 1995.

COYLE, J.T; BIRD, S.J; EVANS, R.H; GULLEY, R.N; NADLER, J.V; NICKLAS, W.J; OLNEY, J.W. Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity and mechanisms of action. **Neuroscience Research Program Bull**. 19(4): 331-427, 1981.

DADA, M.O; CAMPBELL, G.T; BLAKE, C.A. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on somatotrophs and growth hormone secretion in prepubertal male and female rats. **Endocrinology**. 115: 996-1003, 1984

GALDINO, R. S.; SOUZA, C. C. A.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Protein calorie malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to physical exercise. **Nutrition Research**. 20: 257-535, 2000.

GILES, K.W.; MAYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of Deoxyribonucleic Acid. **Nature**. 296 (4975): 93, 1965.

GOBATTO, C A; KOKUBUN, E; SIBUYA, C; 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: 725-726, 1991.

IVY, J. L; ZDERIC, T. W; FOGT, D.L. Prevention and treatment of insulin dependent diabetes mellitus. **Exercise And Sport Science Reviews**. 27: 1-36, 1999.

KATCH, F.I; McARDLE, W.D. Obesity. In: **Introduction to Nutrition, Exercise and Health**. 259-278, 1993.

LARDY, H; SHRAGO, E. Biochemical aspects of obesity. **Annual Reviews of Biochemistry**. 59: 689-710, 1990.

LO, S; RUSSEL, J.C; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**. 28 (2): 234-236, 1970.

LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biologic Chemistry**. 193: 265-275, 1951.

LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteína em músculos de ratos diabéticos. **Revista Paulista de Educação Física**. 12: 202-209, 1999.

MADER, A. and H, HECK. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Journal of Sports Medicine**. 7: 45-65, 1986.

MARMO, M.R; NUNES, M.T; VOLPATO, C.B; KETTELHUT, I.C; HELL, N.S; LIMA, F.B; DOLNIKOFF, M.S. Reduced growth hormone mRNA levels in 28-d-old MSG rats impair protein and lipid metabolism. **European Journal of Physiology**. 427: R29, 1994.

MELLO, M.A.R; SOUZA, C.T; BRAGA, L.R; SANTOS, J.W; RIBEIRO, I; GOBATTO, C.A. Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. **Physiology. Chemistry Physiologic & Medicine**. 33: 63-71, 2001.

NEIVA, C.M; BUNC, V; MELLO, M. Glicemia, insulinemia e trigliciridemia de ratos diabéticos experimentais e alimentados com dieta hiperlipídica, submetidos a treinamento físico por aeróbio e anaeróbio. **Revista Científica da Universidade de Franca**. 34-41, 1999.

REIMER, L.M.D. Obesity a big problem. **Journal Florida Medicine Association**. 79(6): 337-338, 1992.

REMKER, H; WILSDORF, A; MULLER, F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. **Experimental Pathology**. 33(4): 223-232, 1988.

REYBROUK, T; WEYMANS, M; VINCKX, J; STYNS, H; DOLNIKOFF, M.S. Cardiorespiratory function during exercise in obese children. **Acta Paediatrica Scandinavica**. 76: 342-348, 1987.

ROHNER, F. A neuroendocrine reappraisal of the dual-center hypothesis: its implications for obesity and insulin resistance. **International Journal of Obesity**. 517-534, 1995.

SCALFANI, A. Animal models of obesity: classification and characterization. **Zutern Journal of obesity**. 8: 497-508, 1984.

SILVA, M. P. Perfil lipídico de: Efeitos de programas de exercícios aeróbio e anaeróbio em ratos. **Dissertação de Mestrado, Rio Claro (SP), Instituto de Biociências, UNESP**, 1999.

SOUZA, C.T; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Respostas bioquímicas ao exercício agudo de ratos obesos submetidos ao treinamento aeróbio. **Revista Científica Plural**. 2: 59-73, 2001.

TEGTBUR, U; BUSSE, M. W; BRAUMANN, K. M. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. **Medicine and Science of Sports Exercise**. 25: (5): 620-627, 1993.

TOKUYAMA, K.; HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis, torpor and obesity of glutamate treated mice. **American Journal of Physiology**. E407-25, 1986.

VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35: 1389-1394, 2002.

WINICK, M & NOBLE, A. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. **Development of Biology**. 12 (3): 451-466, 1965.

CAPÍTULO 4

VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Lactato mínimo e proteína muscular de ratos durante exercício de natação (Minimum lactate and muscle protein of rats during swimming exercise. **Biology of Sport**. (submitted), 2005.

RESUMO

Poucos estudos tratando da intensidade do esforço durante exercício de natação em ratos têm sido relatados na literatura. Recentemente, utilizando o teste do lactato mínimo (TLM), nosso grupo estimou o lactato sanguíneo mínimo (LSM) de ratos durante exercício de natação em carga equivalente a $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal (pc) à concentração de $7,17 \pm 0,16$ mmol/L de lactato sanguíneo. Esta informação permitiu avaliar a intensidade exata de esforço desenvolvida pelo rato durante a natação. O presente estudo foi designado para avaliar os efeitos do exercício de natação em intensidades inferior, equivalente e superior ao LSM sobre o metabolismo protéico de ratos. Ratos adultos (90 dias), Wistar e sedentários foram utilizados no presente estudo. Os valores médios de LSM para todos os animais, no presente estudo, foram obtidos na concentração sanguínea de $6,72 \pm 0,36$ mmol/L na carga de 5% do pc. Os animais foram sacrificados em repouso (R) ou imediatamente após sessão única de natação (30min) suportando sobrecargas inferior ($3,5\%$ do pc), equivalente (5% do pc) e superior ($6,5\%$

do pc) ao LSM. Amostras de sangue foram coletadas a cada 5 min de exercício para determinação do lactato sanguíneo. Foram avaliadas as taxas de síntese (incorporação de ^{14}C fenilalanina em proteína) e degradação (liberação de tirosina) protéicas do músculo sóleo. A concentração de lactato sanguíneo (mmol/l) estabilizou-se nas cargas inferior ($5,44 \pm 0,012$) e equivalente ($6,40 \pm 0,006$) ao LS, mas elevou-se progressivamente na carga superior. Não houve diferença significativa na síntese protéica (pmol/mg.h) entre valores de repouso ($65,21 \pm 3,40$) e após exercício suportando as cargas inferior ($61,55 \pm 1,30$) e equivalente ($60,73 \pm 1,74$) ao LSM, mas houve decréscimo com a carga superior ($36,62 \pm 1,96$). A taxa de degradação protéica (nmol/g.h) elevou-se após exercício suportando as cargas inferior ($227,01 \pm 6,13$), equivalente ($227,86 \pm 5,97$) e superior ($363,59 \pm 7,11$) ao LSM em relação ao repouso ($214,32 \pm 6,02$). Os resultados indicam a viabilidade da aplicação do TLM em estudos com ratos, uma vez que este se mostrou sensível a alterações metabólicas impostas pelo exercício.

Palavras-chave: lactato sanguíneo mínimo, teste do lactato mínimo, síntese protéica, degradação protéica.

ABSTRACT

Few studies on the effort intensity during swimming exercise in rats have been reported in literature. Recently, with the use of the lactate minimum test (LMT), our group estimated the minimum blood lactate (MBL) of rats during swimming exercises at load equivalent to $4.95 \pm 0.10\%$ of the body weight (bw) and concentration

of 7.17 ± 0.16 mmol/L of blood lactate. This information allowed evaluating the exact effort intensity developed by the rat during swimming exercise. The present study was designed to evaluate the effects of the swimming exercise at intensities below, equivalent and above MBL, on the protein metabolism of rats. Inactive adult male Wistar rats (90 days of age) were used. The MBL mean values for all animals were obtained in the blood concentration of 6.72 ± 0.36 mmol/L at load of $5.16 \pm 0.17\%$ of the body weight. The animals were sacrificed in rest (R) or shortly after a single swimming session (30 min) with loads below (3.5% of the bw), equivalent to (5% of the bw) and above (6.5% of the bw) the MBL. Blood samples were collected each 5 minutes of exercise for blood lactate determination. The protein synthesis (incorporation of ^{14}C phenylalanine into protein) and degradation (tyrosine release) rates in the soleus muscle were evaluated. The blood lactate concentration (mmol/l) stabilized at loads below (5.44 ± 0.012) and equivalent (6.40 ± 0.006) to the MBL, but it progressively elevated in the highest load. No significant differences were found for the protein synthesis (pmol/mg.h) between values in rest (65.21 ± 3.40) and after exercise with loads below (61.55 ± 1.30) and equivalent to the MBL (60.73 ± 1.74); however, a decrease was verified with the highest load (36.62 ± 1.96). The protein degradation rate (nmol/g.h) elevated after exercise with loads below (227.01 ± 6.13), equivalent (227.86 ± 5.97) and above (363.59 ± 7.11) the MBL in relation to values in rest (214.32 ± 6.02). The results indicate the feasibility of the LMT test application in studies with rats, once it seems to be sensitive to metabolic alterations imposed by exercise.

Keywords: minimum blood lactate, lactate minimum test, protein synthesis, protein degradation.

INTRODUÇÃO

O fornecimento de energia para a contração muscular no exercício pode ser derivado dos metabolismos aeróbio e anaeróbio. Durante o exercício, existe uma zona de transição na qual ocorre mudança da predominância de metabolismo aeróbio para o anaeróbio. Essa zona de transição mostrou-se importante na avaliação do condicionamento físico e na prescrição de treinamento (TEGTBUR et al., 2001). Por esse motivo, diversos protocolos fisiológicos de avaliação foram desenvolvidos para detectar essa zona de transição metabólica, muitos deles empregando o lactato sanguíneo como marcador. Dentre os procedimentos mais utilizados na prática encontram-se: o limiar ventilatório observado por WASSERMAN & Mc. ILROY (1965), o limiar anaeróbio (Lan) identificado pelo aumento da concentração sanguínea de lactato, proposto por KINDERMAN et al. (1979), o procedimento que considera a concentração sanguínea de lactato de 4,0 mmol/L como o marco do “início” do acúmulo de lactato sanguíneo (OBLA), sugerido por SJODIN & JACOBS (1981), entre outros.

Tegtbur et al. (1993) desenvolveram um protocolo de teste, para a identificação da transição metabólica, denominado teste do lactato mínimo (TLM). Esse teste envolve a realização de exercício supramáximo, por um breve período de tempo, visando a indução da hiperlactacidemia antes do início do teste padrão com cargas progressivas em esteira rolante. Lactato sanguíneo mínimo (LSM) foi definido como a velocidade na qual a curva em forma de “U”, obtida com os valores de lactato sanguíneo durante o teste progressivo, atinge o nadir. Esse valor mínimo de lactato sanguíneo supostamente indica a transição metabólica (JONES; DOUST, 1998; TEGTBUR et al., 1993; RIBEIRO et al., 2003; VOLTARELLI et al., 2004).

Por razões óbvias, grande número de pesquisas envolvendo o exercício físico tem sido conduzido em animais de laboratório, especialmente o rato e as concentrações de lactato, utilizadas para a determinação da intensidade de esforço. Como existem diferenças metabólicas entre seres humanos e ratos, é razoável especular sobre potenciais diferenças entre espécies com respeito ao fluxo de lactato e outras variantes durante o exercício. Apesar da importância do problema, ainda são raros os estudos que tratam da cinética de lactato em ratos durante o exercício.

Uma vez que a determinação do lactato mínimo requer apenas um teste realizado em um único dia, poderia ser adequado a ratos durante exercício de natação. Dessa forma, nosso grupo recentemente desenvolveu estudos visando padronizar um protocolo para a identificação da transição metabólica em ratos durante a natação utilizando os princípios do TLM estabelecidos por Tegtbur et al. (1993). Em nosso estudo, o LSM médio calculado dos animais foi obtido na carga de $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal, enquanto que a concentração média de lactato sanguíneo foi obtida, nessa carga, à $7,17 \pm 0,16$ mmol/L (VOLTARELLI et al., 2002). Existem, ainda, outros pontos que permanecem obscuros e necessitam de esclarecimento antes do emprego, com finalidades práticas, do TLM em ratos.

OBJETIVO

O presente estudo foi designado para avaliar os efeitos do exercício de natação em intensidades inferior, equivalente e superior ao LSM sobre o metabolismo protéico de ratos sedentários, visando inferir sobre a viabilidade da aplicação do TLM em estudos com ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Todos os experimentos, envolvendo animais, do presente estudo, seguiram as resoluções específicas referentes à Bioética de Experimentos com Animais (Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979; e Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, adultos (90 dias de idade) sedentários, cujas mães eram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) e foram alimentados com ração comercial (Purina®) para roedores e água *ad libitum* bem como mantidos sob ciclo periódico claro e escuro de 12 horas à temperatura média de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Adaptação ao meio líquido: A adaptação consistiu em manter o animal em contato com água rasa à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 3 semanas, 5 dias por semana por 30 minutos. Nas 2^a e 3^a semanas de adaptação, os mesmos suportaram sobrecargas de chumbo inseridas em “mochilas” de pano fechadas com velcro® e atadas ao tórax com o auxílio de um elástico (VOLTARELLI et al. 2002). O propósito da adaptação foi

reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água (GOBATTO et al. 2001).

TLM adaptado às condições do rato: Inicialmente, os animais foram colocados no tanque cheio d'água suportando sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal e exercitaram-se, anaerobiamente (saltos), durante 6 minutos (30 segundos de exercício interrompidos por 30 segundos de repouso), para a elevação da concentração de lactato sanguíneo circulante. Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício de natação com intensidades progressivamente maiores (4,5; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,5 % do peso corporal), com duração de 5 minutos de exercício em cada carga. Antes do início do teste (repouso) e a cada troca de carga, foram coletadas amostras de sangue (25µl) para a determinação do lactato no Analisador Eletroquímico YSL® modelo 1500 SPORT, Yellow Spring, OH, USA (VOLTARELLI et al., 2002).

Teste de Natação com Carga Fixa: Após a realização do TLM no presente estudo, o LSM médio, para todo o grupo (n=24), foi determinado na carga de 5% do peso corporal (pc) na concentração de $6,72 \pm 0,36$ mmol/L de lactato sanguíneo. Baseado nessas informações, 48 horas depois, parte dos animais foram submetidos a testes de natação (sessão única) suportando carga fixa inferior (I= 3,5% do pc; n=8), equivalente (E= 5% do pc; n=8) e superior (S= 6,5% do pc; n=8) ao LSM durante 30 minutos (GOBATTO et al., 2001), para verificar a estabilização do lactato sanguíneo pois, teoricamente, o LSM coincide com a máxima fase estável de lactato (VOLTARELLI et al., 2004). Foram coletadas amostras sanguíneas durante o teste para a determinação do lactato a cada 5 minutos de exercício. Os animais foram sacrificados, por decapitação com utilização de guilhotina, em repouso (R; n=8) ou imediatamente após os testes,

para avaliação das taxas de síntese e degradação protéicas do músculo sóleo, como descrito a seguir:

Síntese Protéica: Fatias longitudinais (70mg) musculares foram pré-incubadas por 30 minutos em meio RPMI-1640 (com glutamina e sem fenol vermelho e bicarbonato de sódio), suplementado com albumina sérica bovina desengordurada (BSA) [0,1%] e insulina [100u/ml], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 uCi/ml] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. O material TCA-insolúvel foi lavado 3 vezes com TCA 5%. O precipitado resultante foi dissolvido em (SDS) 10% à temperatura ambiente por 30 minutos, para a determinação do conteúdo protéico e da radioatividade incorporada às proteínas musculares. O conteúdo de proteína muscular foi determinado pelo método folin fenol (LOWRY et al., 1958) e a radioatividade incorporada à proteína muscular foi medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica foi calculada dividindo-se a radioatividade incorporada pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação e expressa como nanomoles de fenilalanina por miligrama de proteína por 2 horas.

Degradação Protéica: A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice da degradação protéica, conforme descrito previamente por FULKS et al. (1973). Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias longitudinais musculares (70mg) foram pré-incubadas em tampão Krebs-Ringer [NaCl 1,2 mmol/L; KCl 4,8 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; CaCl₂ 2,5 mmol/L; KH₂PO₄ 1,2 mmol/L e

MgSO₄ 1,2 mmol/L – pH 7,4] suplementado com glicose [5,5 mmol/L], BSA [1,34%], insulina [5u/ml] e ciclohexamida [5,0 mmol/L], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio de mesma composição e incubada por 2 horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para determinação do teor de tirosina pelo procedimento de WAALKES & UDENFRIEND (1957).

Análise Estatística: Os dados foram expressos como Média ± Desvio Padrão. Os procedimentos estatísticos incluíram Análise de Variância (ANOVA), seguida de BONFERRONI, onde apropriado. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra os valores médios de LSM (lactato sanguíneo mínimo *versus* carga de trabalho) durante realização do TLM, para todos os animais (n=24). O LSM médio ocorreu na carga de $5,2 \pm 0,2\%$ do peso corporal à concentração de $6,7 \pm 0,4$ mmol/L de lactato sanguíneo.

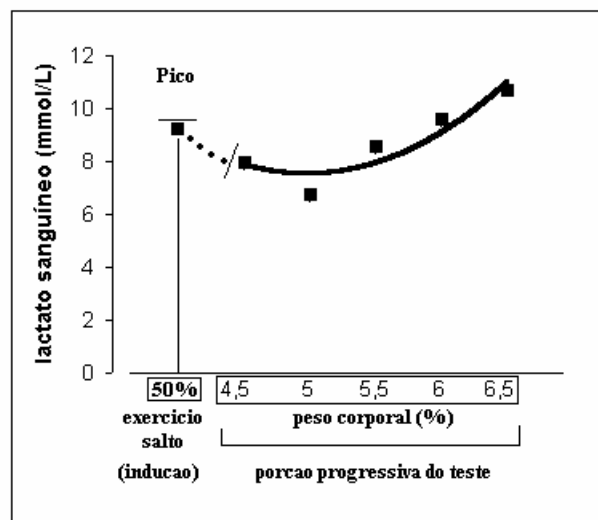


Figura 1: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo. O lactato sanguíneo mínimo médio, para todos os animais (n=24), foi obtido na carga de $5,2 \pm 0,2\%$ do peso corporal à $6,7 \pm 0,4$ mmol/L de lactato sanguíneo.

Após a determinação do LSM, os animais foram submetidos a testes de natação com carga fixa em intensidades inferior, equivalente e superior ao LSM. Os resultados são apresentados na Figura 2. Nota-se que as concentrações de lactato sanguíneo estabilizaram-se, a partir do 15º minuto durante o exercício com cargas inferior e equivalente ao LSM. Por outro lado, na carga superior, a concentração de lactato sanguíneo elevou-se progressivamente.

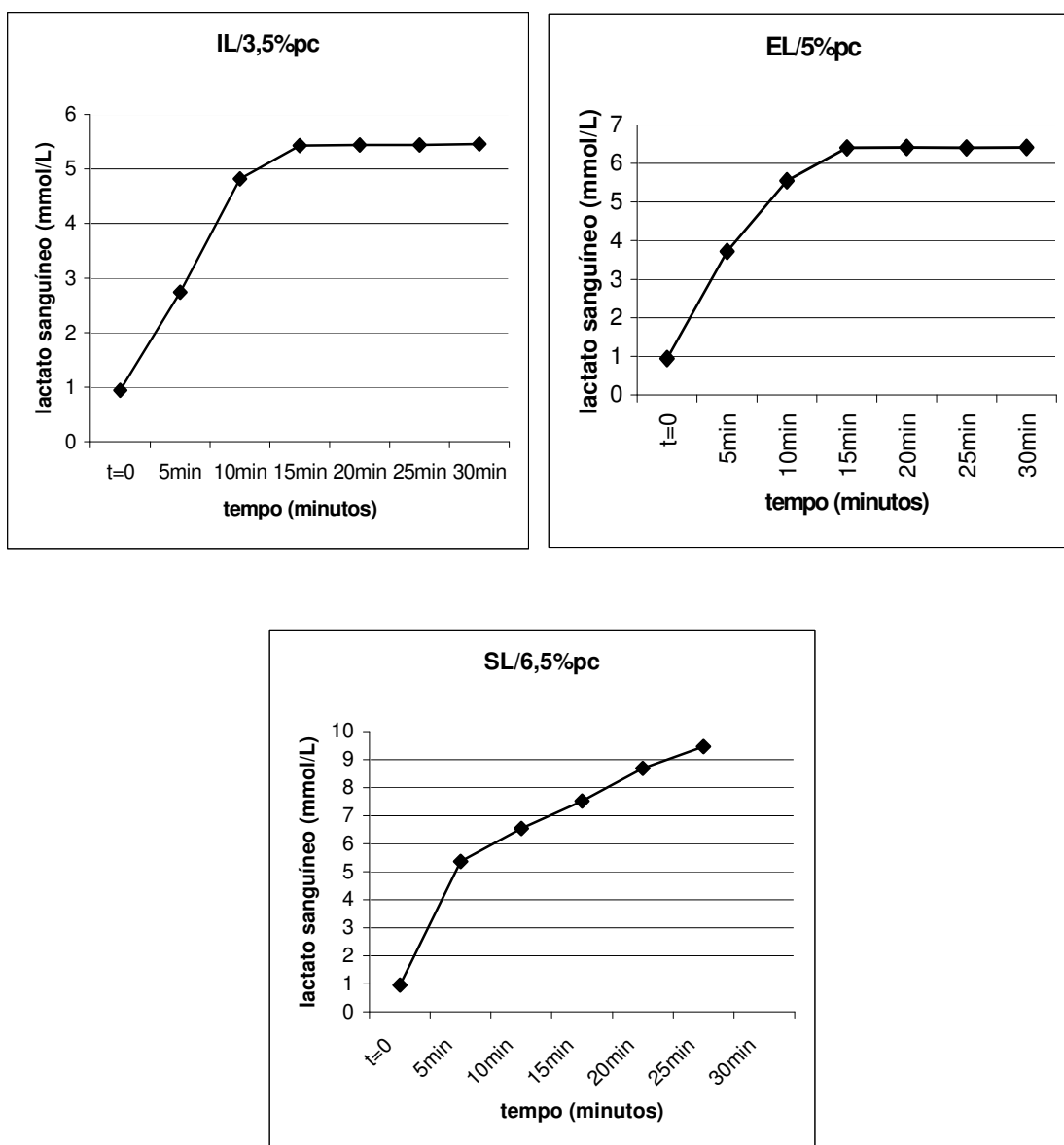
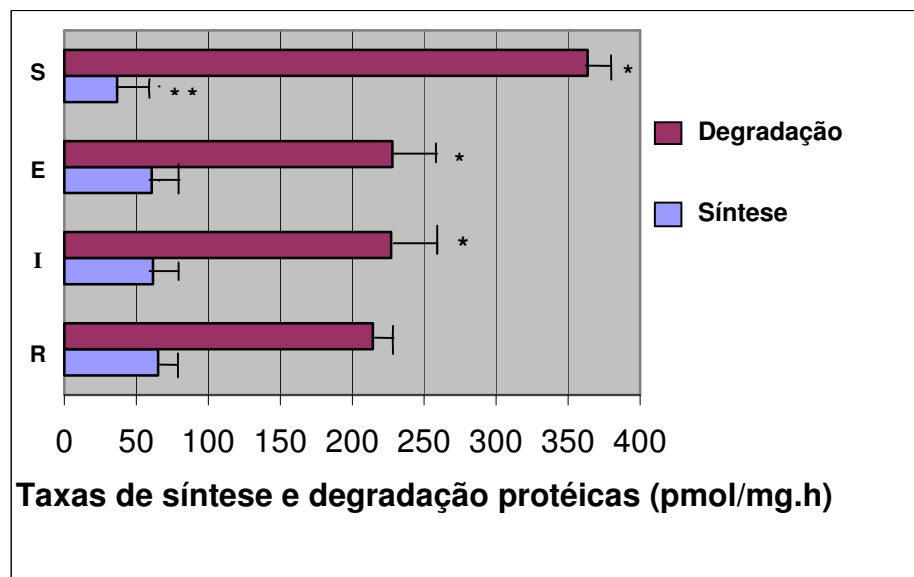


Figura 2: Valores médios de lactato sanguíneo vs tempo de exercício durante teste de carga fixa realizado pelos animais suportando sobrecargas inferior (n=8), equivalente (n=8) e superior (n=8) ao lactato sanguíneo mínimo. As concentrações médias de lactato sanguíneo estabilizaram-se em $5,4 \pm 0,01$ e $6,4 \pm 0,006$ mmol/L de lactato sanguíneo nas cargas inferior e equivalente ao LSM, respectivamente. Na carga superior, a mesma elevou-se progressivamente.

A Figura 3 contém os valores médios referentes às taxas de síntese e degradação protéicas no músculo sóleo de ratos sacrificados em repouso e após realização do teste de natação suportando carga fixa inferior, equivalente e superior ao LSM. As taxas médias de síntese protéica (pmol/mg.h) apresentadas após exercício suportando cargas inferior e equivalente não mostraram diferença significativa quando comparadas ao repouso. Por outro lado, a síntese protéica sofreu redução significativa após exercício suportando carga superior ao LSM. Após o exercício, em todas as cargas, houve aumento significativo das taxas médias de degradação protéica (pmol/mg.h), que foi mais acentuada após o exercício com a carga superior ao LSM.

Figura 3: Taxas de síntese e degradação protéicas (pmol/mg.h) no músculo sóleo de ratos sacrificados em repouso (**R**) e após realização do teste de natação suportando carga fixa inferior (**I** = 3,5% do peso corporal), equivalente (**E** = 5% do peso corporal), superior (**S** = 6,5% do peso corporal) ao lactato sanguíneo mínimo.



* $p < 0,05$ em relação à situação de repouso;
 ** $p < 0,05$ em relação às demais situações.

DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras tentativas, as bases fisiológicas para o acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício ainda não foram totalmente elucidadas. Em diferentes estudos, a hipótese de que a formação de lactato durante o exercício submáximo seja devida a hipóxia tecidual foi questionada. Estudos demonstraram que mesmo frente a cargas moderadas de exercício (50-75% do VO_2 max) e, portanto, com concentrações intracelulares adequadas de oxigênio, já ocorre acúmulo de lactato tanto no músculo quanto no sangue (BROOKS, 1985; CAMPBELL et al., 1989). Pesquisas com cães mostraram, também, que há acúmulo de lactato nos músculos em cargas tão baixas quanto 10% do VO_2 max (CONETT et al., 1981). Tais evidências contestam a relação causa/efeito entre produção de lactato e hipóxia tecidual, sugerindo algum outro fator que não a limitação na oferta de oxigênio como responsável pelo aumento da produção muscular de lactato no exercício. Apesar disso, a determinação de “limiares”, isto é, determinação da intensidade de exercício, na qual ocorre a transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio, tem-se mostrado ferramenta útil na prescrição de exercícios (SJODIN et al. 1981; JONES e CARTER, 2000; SIMÕES et al. 2000; BILLAT et al. 2003).

Para fins práticos, a identificação da transição metabólica tem sido feita submetendo-se o sujeito a esforços com cargas progressivamente mais elevadas e utilizando-se o lactato sanguíneo como marcador. A determinação do limiar pode ser feita baseando-se no desvio da linha de base da concentração circulante de lactato (Lan) ou na intensidade de trabalho correspondente a uma concentração fixa de lactato circulante (OBLA). O primeiro método fundamenta-se no fato de que o aumento não linear da concentração de lactato sanguíneo em relação à intensidade do exercício indica

a transição do metabolismo, conforme definiram KINDERMAN et al. (1979). Já o segundo procedimento assume o princípio de que até uma determinada concentração circulante de lactato, ocorre um equilíbrio entre a produção muscular e a remoção desse substrato da circulação, conforme postularam SJODIN & JACOBS (1981) e HECK et al. (1985).

A determinação de limiares tem-se mostrado, também, valiosa em estudos clínicos (WASSERMAN e Mc. ILROY, 1964; NEIVA et al. 1999). Uma vez que existem limitações óbvias nas pesquisas com seres humanos, em especial nos estudos clínicos, modelos animais têm fornecido importantes informações quanto à realização de exercício físico sob diversas condições experimentais, incluindo obesidade (SCALFANI, 1988; VOLTARELLI et al. 2003), diabetes (LUCIANO e MELLO, 1999), desnutrição (GALDINO et al. 2000; PRADA et al. 2004) e jejum (VOLTARELLI et al. 2004).

No TLM originalmente descrito por TEGTBUR et al. (1993) para humanos, a acidose láctica inicial foi induzida em atletas por duas corridas exaustivas consecutivas. A segunda corrida foi seguida por 8 minutos de recuperação (andar lento). Em seguida, foi iniciado o teste progressivo de corrida.

Com base nessas informações, desenvolvemos, em nosso laboratório, um teste para determinar o lactato sanguíneo mínimo durante exercício de natação, utilizando os princípios básicos do TLM proposto por TEGTBUR et al. (1993), adaptado às condições do rato (VOLTARELLI et al. 2002; VOLTARELLI et al. 2004). O LSM de ratos sedentários no primeiro estudo (VOLTARELLI et al. 2002), foi obtido na carga média calculada de $4,9 \pm 0,1\%$ do peso corporal do animal na concentração média de lactato sanguíneo calculada de $7,2 \pm 0,2 \text{ mmol/L}$. O treinamento físico

aumentou a carga (5,9% do peso corporal) e reduziu a concentração sanguínea de lactato ($5,9\pm 0,1$ mmol/L) na qual o LSM foi obtido (VOLTARELLI et al. 2004).

Os valores médios calculados de intensidade de exercício e lactato sanguíneo, correspondentes ao LSM de todos os animais do presente estudo, estão contidos na Figura 1. Como se pode verificar, a carga de exercício e concentração de lactato sanguíneo, equivalentes ao LSM, mostraram-se semelhantes aos valores obtidos por VOLTARELLI et al. (2002). Tais resultados sugerem potencial aplicação deste procedimento em estudos que visem avaliação do condicionamento físico e a prescrição de exercício de natação para ratos. Contudo, antes da adoção do teste com estas finalidades, é necessário conhecer melhor as respostas metabólicas decorrentes da aplicação dessa técnica.

A proposta principal do presente estudo foi avaliar os efeitos do exercício de natação em intensidades inferior, equivalente e superior ao LSM sobre o metabolismo protéico de ratos durante sessão única de exercício de natação.

A Figura 2 contém os valores das concentrações de lactato sanguíneo de ratos durante a realização de teste de natação (30 minutos) suportando carga fixa inferior, equivalente e superior ao LSM. Estes testes foram efetuados com o intuito de checar a estabilização do lactato sanguíneo durante exercício realizado nessas intensidades, de acordo com o protocolo proposto por GOBATTO et al. (2001).

Voltarelli et al (2002) realizaram procedimento semelhante ao do presente estudo (sessão única de exercício de natação, onde animais sedentários e eutróficos suportaram carga fixa equivalente ao LSM) e observaram estabilização da concentração de lactato sanguíneo em $6,4\pm 0,3$ mmol/L na intensidade de 5,0% do peso

corporal. Valores médios semelhantes de carga de exercício e estabilização da concentração de lactato sanguíneo (5,0% do pc à $6,4 \pm 0,006$ mmol/L) foram observados nos animais que realizaram exercício na intensidade do LSM. Quando os animais nadaram suportando carga inferior ao LSM, o lactato sanguíneo estabilizou-se em concentrações inferiores ($5,4 \pm 0,01$). Por outro lado, não foi observada estabilização do lactato sanguíneo quando o exercício foi realizado em intensidade superior ao LSM. Vale ressaltar, também, que nenhum dos animais que efetuaram exercício na última situação conseguiram finalizar o teste, em função de fadiga aos 25 minutos.

Isso sugere que as taxas de produção e remoção do lactato sanguíneo equivaleram-se durante o esforço realizado nas intensidades inferior e equivalente ao LSM e mostraram desequilíbrio quando a carga aplicada foi superior ao mesmo. Tais achados permitiram, com mais segurança, caracterizar as intensidades aplicadas no presente estudo como inferior (3,5% do peso corporal), equivalente (5,0% do peso corporal) e superior (6,5% do peso corporal) à transição metabólica.

Visando determinar as taxas de síntese (incorporação de ^{14}C fenilalanina em proteína) e degradação (liberação de tirosina) protéicas no músculo sóleo, os ratos foram sacrificados em repouso ou após a realização de sessão única de exercício de natação suportando carga fixa inferior, equivalente e superior ao LSM. Tal procedimento foi importante para avaliar se o LSM estimado pelo protocolo aqui descrito é sensível a outras alterações metabólicas impostas pelo exercício.

Como mostrado na Figura 3, as taxas médias de síntese protéica (pmol/mg.h) obtidas após exercício nas cargas inferior (n=8; $61,5 \pm 1,3$) e equivalente (n=8; $60,7 \pm 1,7$) ao LSM não mostraram diferença significativa quando comparadas com os valores de repouso (n=8; $65,2 \pm 3,4$). No entanto, esse índice reduziu-se de

forma significativa quando o exercício foi realizado com a carga superior ao LSM (n=8; $36,6 \pm 2,0$). Isso sugere que o LSM seja um indicador sensível de alterações do metabolismo protéico impostas pelo exercício.

As taxas médias de degradação protéica no músculo sóleo (pmol/mg.h) (Figura 3) de ratos sacrificados em repouso e após efetuação de sessão única de exercício de natação suportando intensidade fixa inferior (n=8; $227,0 \pm 6,1$), equivalente (n=8; $227,9 \pm 6,0$) e superior (n=8; $363,6 \pm 7,1$) ao LSM foram superiores às observadas em repouso (n=8; $214,3 \pm 6,0$). Os maiores valores apareceram quando os animais se exercitaram na carga superior ao LSM. Esses resultados reforçam a hipótese de que o LSM seja um indicador sensível de alterações no metabolismo protéico muscular decorrentes do exercício.

Cabe destacar que o procedimento de análise do metabolismo protéico, aqui empregado, foi realizado *in vitro* e na presença de insulina, hormônio que estimula síntese protéica muscular (GARLICK & GRANT, 1988). As taxas médias indicadoras do metabolismo protéico, obtidas no músculo sóleo de ratos submetidos à sessão única de exercício de natação mostram que a síntese foi reduzida e a degradação foi aumentada nos animais que se exercitaram na carga superior ao LSM. Tal fato pode consequência do exercício ter sido realizado em intensidade superior à transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio e gerado inibição na cascata de sinalização ativada pela insulina, reduzindo a síntese e permitindo a degradação protéica muscular (DARDEVET et al., 2000). Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos do exercício físico realizado em intensidades inferior, equivalente e superior ao LSM sobre o metabolismo protéico muscular de ratos.

CONCLUSÕES

- O conjunto dos resultados do presente estudo mostra a adequação do protocolo do TLM aplicado a ratos durante exercício de natação;
- O padrão de respostas referentes aos índices do metabolismo protéico no músculo esquelético de ratos, evidenciou que o exercício físico de natação realizado pelos animais suportando carga fixa superior ao LSM promove redução da síntese e aumento da degradação protéica muscular;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLAT, V.L; SIRVENT, P; KORALSZTEIN, J.P; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science (review). **Sports Med.** 33(6): 407-426, 2003.

BROOKS, G.A. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. **Med. Sci. Sports Exer.** 7(1): 22-31, 1985.

BROOKS, G.A; Intra-and extra cellular lactate shuttles. **Med. Sci. Sports Exer.** 32: 790-799, 2000.

CAMPBELL, M.E; HUGHSON, R.L; GREEN, H.J. Continuous increase in blood lactate concentration during different ramp exercise protocols. **J. Appl. Physiol.** 66 (3): 1104-1107, 1989.

CONNETT, R.J; GAYESKI, T.E; HONIG, C.R. Lactate accumulation in fully aerobic working dog gracilis muscle. **Am. J. Physiol.** 246: H120-H128, 1984.

DARDEVET, D; SOMET, C; BALAGE, M; GRIZARD, J. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **J. Nutr.** 130: 2630-2635, 2000.

FULKS, R.M; LI, J.B; GOLDBERG, J.L. **J. Biol. Chem.** 250: 290-298, 1975.

GALDINO, R. S.; SOUZA, C. C. A.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Protein calorie malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to physical exercise. **Nutr. Res.** 20: 257-270, 2000.

GARLICK, P.J; GRANT, I. Amino acid infusion increases the sensitivity of protein synthesis to insulin: effects of branched chain amino acids. **Biochem. J.** 254: 579-584, 1998.

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. Bioch. Physiol.** 130: 21-27, 2001.

HECK, H; A. MADER; G. HESS; S. MUCK and W, HOLLMAN. Justification of the 4.0 mmol/L lactate threshold. **Int. J. Sports Med.** 6: 117-130, 1985.

JONES, A. M. and J. H. DOUST. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 km running performance. **Med. Sci. Sports. Med.** 30: 1304-1313, 1998.

JONES, A. M. and CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Med.** 29: 373-376, 2000.

KHATZ, A. and SAHLIN, K. Role of oxygen in regulation of glycolysis and lactate production in human skeletal muscle. **Exerc. Sports Sci.** 19(39): 1-28, 1990.

KINDERMAN, W; G. SIMON and J, KEUL. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur. J. Appl. Physiol.** 42: 25-34, 1979.

LOWRY, O.H; ROSEBROUG, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.T. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275, 1951.

LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteína em músculos de ratos diabéticos. **Rev. Paul. Educ. Fís.** 12: 202-209, 1999.

NEIVA, C.M; BUNC, V; MELLO, M. Glicemia, insulinemia e trigliceridemia de ratos diabéticos experimentais e alimentados com dieta hiperlipídica, submetidos a treinamento físico por aeróbio e anaeróbio. **Rev. Cient. Univ. Franca.** 201-210, 1999.

PRADA, F.J.A; VOLTARELLI, F.A; OLIVEIRA, C.A.M.O; GOBATTO, C.A; MACEDO, D.V; MELLO, M.A.R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Rev. Bras. Ciência Mov.** 29-34, 2004.

RIBEIRO, L; BALIKIAN, P; MALACHIAS, P; BALDISSERA, V. Stage length, spline function and lactate minimum swimming speed. **J. Sports Med. Physic. Fit.** 43(3): 312-318, 2003.

SCALFANI, A. Animal models of obesity: classification and characterization. **Zut. J. Obes.** 8: 497-508, 1988.

SIMÕES, H.G; CAMPBELL, C.S.G; TANGO, M.H; MELLO, F; MAZIERO, D.C; BALDISSERA, V. Lactate minimum test in swimming relationship to performance and maximal lactate steady state. **Med. Sci. Sports Exerc.** 32: S161, 2000.

SJODIN, B. and I, JACOBS. On set of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int. J. Sports Med.** 2: 23-26, 1981.

TEGTBUR, U; M. W. BUSSE and K. M. BRAUMANN. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 25(5): 620, 627, 1993.

TEGTBUR, U; MACHOLD, H; MEYER, H; STORP, D; BUSSE, M.W. Determining the extent of extensive physical performance in patients with coronary heart disease. **Zeit. Kardiol.** 90: 627-645, 2001.

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: 1389-1394, 2002.

VOLTARELLI, F.A; NUNES, W.M.S; SANTHIAGO, V; PAULI, J.R; GARCIA, D.R; ROMERO, C.E.M; SILVA, A.S; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determinação do Limiar Anaeróbio em Ratas Obesas com Glutamato Monossódico (MSG). **Rev. Logos.** (11): 84-93, 2003.

VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A; GOBATTO, C.A. Glicogênio muscular e limiar anaeróbio determinado em ratos durante natação. **Rev. Motriz.** 10: 35-40, 2004.

VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A; GOBATTO, C.A. Limiar anaeróbio determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: efeito dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. **Rev. Port. Ciências Desp.** 4(3): 16-25, 2004.

WAALKES, T.P; UDENFRIEND, S. Tyrosine in plasma and tissues. **J. Lab. Clin. Med.** 50(5): 733-736, 1957.

WASSERMAN, K. and M. B. MC. ILROY. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Amer. J. Cardiol.** 14: 844-852, 1965.

4- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS

O presente estudo teve como propósito avaliar a validade do teste do lactato mínimo (TLM) na determinação do Limiar Anaeróbio (Lan) de ratos durante exercício de natação. Para tanto, foi testada a sensibilidade do teste às modificações impostas por: treinamento físico (8 semanas), redução dos estoques musculares de glicogênio causado por jejum de 12 e 48 horas e obesidade induzida pelo tratamento com glutamato monossódico. Foram avaliadas, também, as alterações do metabolismo protéico muscular durante o exercício de natação realizado em intensidades inferior, equivalente e superior ao Lan.

O primeiro estudo buscou verificar a relação entre teor reduzido de glicogênio muscular (Jejum de 48 horas) e Lan determinado pelo TLM em ratos durante exercício de natação. Os resultados desse estudo mostraram que a resposta dos animais foi semelhante àquela descrita na literatura para seres humanos (TEGTBUR et al., 1993), ou seja, a depleção dos estoques de glicogênio muscular não alterou a carga de trabalho equivalente ao Lan, mas reduziu a concentração sanguínea na qual o mesmo ocorreu. A menor concentração de lactato sanguíneo, equivalente ao Lan, apresentada pelos animais submetidos ao jejum pode ser explicada pela diminuição no conteúdo total de glicogênio do músculo sóleo dos mesmos em relação aos animais alimentados. Tal situação, sabidamente, reduz oxidação de carboidratos, a síntese de glicogênio, e,

principalmente, a menor produção muscular de lactato (LI et al., 1993). Por outro lado, a intensidade (carga de exercício) equivalente ao Lan não foi afetada pela redução dos estoques musculares de glicogênio, indicando a fidedignidade da técnica utilizada para estimá-lo.

Para avaliar a reprodutibilidade do TLM, realizamos um segundo estudo. Numa primeira série de experimentos, buscamos verificar as influências de modificações moderadas nos estoques musculares de glicogênio (jejum de 12 horas) sobre os valores obtidos no teste. Como resultado dessa etapa de experimentos, novamente a depleção dos estoques de glicogênio muscular pelo jejum não alterou a intensidade de exercício equivalente ao Lan, mas reduziu a concentração sanguínea na qual o mesmo ocorreu, confirmando a reprodutibilidade e fidedignidade do teste.

Em outra etapa desse mesmo estudo, o TLM foi avaliado quanto à sensibilidade ao treinamento físico de 8 semanas, realizado na intensidade equivalente ao Lan individual, determinado previamente por esse teste. Após 4 semanas de treinamento, efetuou-se um TLM visando ajustar a carga de trabalho dos animais (necessário para dar continuidade ao processo de treinamento de 8 semanas) e determinar o Lan nessa intensidade de exercício. Observou-se melhora nos valores referentes ao Lan individual dos animais quando comparados com os valores na situação sedentária e com os valores encontrados em ratos sedentários por Voltarelli et al. (2002). Ao final de 8 semanas de treinamento físico, os valores referentes ao Lan dos animais novamente apresentaram melhora significativa quando comparados com aqueles observados na situação sedentária, após 4 semanas de treinamento e ainda com os valores obtidos por Voltarelli et al. (2002). Tais achados evidenciam a sensibilidade

do TLM às alterações impostas pelo treinamento e a evolução no condicionamento aeróbio dos ratos em função do protocolo de treinamento.

No terceiro estudo, visamos determinar o Lan de ratas obesas tratadas com MSG durante através do TLM de natação. Nesse trabalho, a análise dos valores obtidos de lactato sanguíneo e glicogênio muscular sugeriram menor intensidade de esforço para animais obesos do que para ratos controle na mesma carga de trabalho. Tal achado pode ser decorrência do fato de as ratas obesas apresentarem densidade corporal significativamente menor do que as ratas controle. Isso pode facilitar a flutuação na natação, implicando em redução na intensidade de esforço. Para a avaliação de animais com densidade corporal alterada, talvez devam ser realizados protocolos de exercícios progressivos tomando por base a densidade e não o peso corporal.

Visando avaliar os efeitos do exercício de natação em intensidades inferior, equivalente e superior ao LSM sobre o metabolismo protéico de ratos durante sessão única de exercício de natação realizamos o quarto e último estudo da presente Dissertação de Mestrado. Nesta etapa do trabalho a denominação Limiar Anaeróbio (Lan) foi substituída por Lactato Sanguíneo Mínimo (LSM), para indicar a transição metabólica (do aeróbio para o anaeróbio) durante a realização do Teste do Lactato Mínimo (TLM). Tal alteração decorreu da controvérsia entre diferentes autores com respeito ao fato de o LSM equivaler ou não ao Lan obtido em testes incrementais (BILLAT et al., 2003). Nesse estudo, as taxas médias indicadoras do metabolismo protéico, obtidas no músculo sóleo de ratos submetidos à sessão única de exercício de natação, mostram que a síntese foi reduzida e a degradação foi aumentada nos animais que se exercitaram na carga superior ao LSM. Tal fato pode ser conseqüência do

exercício ter sido realizado em intensidade superior à transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio.

A partir do conjunto de resultados dos 4 estudos aqui apresentados e discutidos, podemos concluir pela viabilidade do emprego do TLM na determinação da transição metabólica em ratos durante exercício de natação.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACON, L; KERN, M. Evaluation a test protocol for predicting maximum lactate steady state. **Journal Sports Medicine Physical Fitness**. 39: 300-308, 1999.

BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold and maximal lactate steady state in rowing. **Medicine and Science of Sports Exercise**. 27: 863-867, 1995.

BILLAT, V.L; SIRVENT, P; KORALSZTEIN, J.P; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science (review). **Sports Med.** 33(6): 407-426, 2003.

BROOKS, G.A. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. **Med. Sci. Sports Exer.** 7(1): 22-31, 1985.

CAMPBELL, M.E; HUGHSON, R.L; GREEN, H.J. Continuous increase in blood lactate concentration during different ramp exercise protocols. **J. Appl. Physiol.** 66 (3): 1104-1107, 1989.

CARTER, H; JONES, A.M; DOUST, J.H. Effect of 6 weeks of endurance training on the lactate minimum speed. **Journal of Sports Science**. 17(12): 956-967, 1999.

CONNETT, R.J; GAYESKI, T.E; HONIG, C.R. Lactate accumulation in fully aerobic working dog gracilis muscle. **Am. J. Physiol**. 246: H120-H128, 1984.

DENIS, C. Effect of 40 weeks of endurance training on anaerobic threshold. **International Journal of Sports Medicine**. 3: 208-214, 1982.

FARREL, P.A. Plasma lactate accumulation and distance running performance. **Medicine and Science of Sports Exercise**. 11: 338-344, 1979.

GALDINO, R.S; SOUZA, C.C.A; LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Protein calorie malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to physical exercise. **Nutrition Research**. 20: 257-535, 2000.

GOBATTO, C A; KOKUBUN, E; SIBUYA, C; 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: 725-726, 1991.

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**. 130: 21-27, 2001.

HECK, H; A. MADER; G. HESS; S. MUCK and W, HOLLMAN. Justification of the 4,0 mmol/L lactate threshold. **International Journal of Sports Medicine**. 6: 117-130, 1985.

IVY, J. L; ZDERIC, T. W; FOGT, D.L. Prevention and treatment of insulin dependent diabetes mellitus. **Exercise And Sport Science Reviews**. 27: 1-36, 1999.

JONES, A. M. and J. H. DOUST. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 Km running performance. **Medicine and Science of Sports Exercise**. 30: 1304 – 1313, 1998.

KHATZ, A. and SAHLIN, K. Role of oxygen in regulation of glycolysis and lactate production in human skeletal muscle. **Exercise Sports Science**. 19 (39): 1-28, 1990.

KINDERMAN, W; SIMON, G; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **European Journal of Applied Physiology**. 42: 25-34, 1979.

KRUGER, J.S; SCHNETTLER, H; HECK, H; HOLLMANN, W. Relationship between rectangular triangular increasing workload and maximal lactate steady state on the crank ergometer. **Sports, Medicine and Health**. 10: 685-690, 1990.

LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteína em músculos de ratos diabéticos. **Revista Paulista de Educação Física**. 12: 202-209, 1999.

LANG FORT, J; ZARZECZNY, R; PILLIS, W; KACIUBA-USCILKI, H; NAZAR, K; PORTA, S. Effects of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 114A: 51-55, 1996.

LI, JING; STILLMAN, J.S; CLORE, J.N; BLACKARD, W.G. Skeletal muscle lipids and glycogen mask substrate competition (Randle cycle). **Metabolism**. 42 (4): 451-456, 1993.

MADER, A; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **International Journal of Sports Medicine**. 79(1): 45-65, 1986.

MITCHELL, J.H; BLOQUIST, G. Maximal oxygen consumption. **National Engage Journal of Medicine**. 284: 1018-1022, 1971.

NEIVA, C.M; BUNC, V; MELLO, M. Glicemia, insulinemia e trigliceridemia de ratos diabéticos experimentais e alimentados com dieta hiperlipídica, submetidos a treinamento físico por aeróbio e anaeróbio. **Revista Científica da Universidade de Franca**- 201-210, 1999.

PIERRE, E.F. Effects of training specificity on lactate threshold and VO_{2max} .
International Journal of Sports Medicine. 11: 267-272, 1990.

PILLIS, W; ZARZECNY, R; LANG FORT, J; KACIUBA-USCILO, H; NAZAR, K;
WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. **Comparative Biochemistry and
Physiology.** 10(6A): 285-289, 1993.

SCALFANI, A. A animal model of obesity: classification and characterization. **Zutern
Journal of Obesity.** 8: 497-508, 1988.

SIMÕES, H.G; CAMPBELL, C.SG; TANGO, M.H; MELLO, F; MAZIERO, D.C;
BALDISSERA, V. Lactate minimum test in swimming: relationship to performance and
maximal lactate steady state. **Medicine and Science of Sports Exercise.** 32: S161,
2000.

SJODIN, B; JACOBS, I. On set of blood lactate accumulation and marathon running
performance. **International Journal of Sports Medicine.** 2: 23-26, 1981.

STEGMANN, K; KINDERMANN, W. Comparison of prolonged tests at the individual
anaerobic threshold and the fixed anaerobic threshold of 4,0mmol/L lactate.
International Journal of Sports Medicine. 3: 105-110, 1982.

TEGTBUR, U; M. W. BUSSE and K. M. BRAUMANN. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise . **Medicine and Science of Sports Exercise**. 25: (5): 620-627, 1993.

TORUN, B; VITERI, F. Influence of exercise on linear lactate. **European Journal of Clinical Nutrition**. 48(1): 5186-5190, 1994.

VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35: 1389-1394, 2002.

WASSERMAN, K. and M. B. MC. ILROY. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **American Journal of Cardiology**. 14: 844-852, 1964.

6- ABSTRACT

The break point of the curve blood lactate vs exercise load has been called Anaerobic Threshold (AT) and is considered a good indicator of exercise capacity in human subjects. There are few studies of AT determination in rats. The present study aimed the determination of the AT in adult rats by the lactate minimum test (LMT) and to verify: a) the effects of muscle glycogen stores on AT determined by LMT; b) the sensibility of the LMT to the alterations of the aerobic conditioning imposed by physical training; c) the applicability of the LMT to rats with altered metabolic condition and d) the effects of the swimming exercise performed at intensities below, equivalent and above AT, on the protein metabolism of rats. The LMT is based on the premise that during an incremental exercise test performed after a bout of maximal exercise, blood lactate decreases to a minimum value and then increases again. Thus, the minimum value indicates the intensity of the AT. The initial state of lactic acidosis was obtained by making the animals jump into the water while carrying a load equivalent of 50% of body weight (bw) for 6 min (30-s exercise interrupted by a 30-s rest). After a 9-min rest, blood was collected and the incremental test was started. The incremental test consisted of swimming while supporting increasing (0,5% of bw) loads from 4,0% of bw until exhaustion. Each exercise load lasted 5 min and was followed by a short time rest, during which blood samples were collected. LMT was applied to rats

in different conditions: sedentarism, exercise-training, muscle glycogen depletion (12 or 48h fast) and metabolic disturbance (monosodium glutamate induced obesity). The effects of swimming exercise performed at intensities below, equivalent and above to AT on protein metabolism was also evaluated. According to the results: a) physical training increased the work load corresponding to the AT and decrease the blood lactate concentration in which appeared, indicating the sensibility of the test to the alterations of the aerobic conditioning caused by training; b) the depletion of the muscle glycogen stores imposed by fasting did not modify the work load at AT, but reduced the blood lactate concentration; c) the reduced body density associated to obesity did not change the workload equivalent to AT but reduced the blood lactate concentration at this load, showing the viability of LMT to animals submitted to metabolic disturbance; d) the LMT seems to be sensitive to metabolic alterations (protein metabolism) imposed by exercise and e) taken together these findings indicate the feasibility of the LMT test application in studies with rats.