PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**ANÁLISE DE PARÂMETROS DE FORÇA E PADRÃO DE NADO DE RATOS
CONTROLES E OBESOS, A PARTIR DE UM SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE
SINAIS EM NATAÇÃO ATADA. INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO
EXERCÍCIO E DA DENSIDADE CORPORAL**

IVAN GUSTAVO MASSELLI DOS REIS

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

Junho - 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências

Campus de Rio Claro

IVAN GUSTAVO MASSELLI DOS REIS

ANÁLISE DE PARÂMETROS DE FORÇA E PADRÃO DE NADO DE RATOS
CONTROLES E OBESOS, A PARTIR DE UM SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE SINAIS
EM NATAÇÃO ATADA. INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO EXERCÍCIO E DA
DENSIDADE CORPORAL

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade
(Área da Motricidade Humana).

Orientador: Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto

Rio Claro - SP

2010

IVAN GUSTAVO MASSELLI DOS REIS

ANÁLISE DE PARÂMETROS DE FORÇA E PADRÃO DE NADO DE RATOS
CONTROLES E OBESOS, A PARTIR DE UM SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE SINAIS
EM NATAÇÃO ATADA. INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO EXERCÍCIO E DA
DENSIDADE CORPORAL

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade
(Área da Motricidade Humana).

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto

Profa. Dra. Eliete Luciano

Prof. Dr. René Brenzikofer

Rio Claro, 31 de maio de 2010

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais José Ivan Figueiredo dos Reis e Maria de Lourdes Masselli.

Agradecimentos

Aos professores Dra. Maria Alice Rostom de Mello (Departamento de Educação Física da UNESP Rio Claro) e Dr. Luiz Eduardo Barreto Martins (Faculdade de Educação Física da Unicamp) que participaram da elaboração do modelo experimental de indução da obesidade por meio da dieta e do sistema de aquisição de sinais (célula de carga, amplificador do sinal, módulo de captura e condicionamento do sinal, software para visualização e análise do sinal), respectivamente.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro concedido no 1º ano e mais uma vez a FAPESP, depois da IC, pelo suporte no 2º ano de mestrado.

Aos amigos que conheci nesses 6 anos de UNESP Rio Claro, especialmente os integrantes da turma BEF 2004, com os quais tive o prazer de conviver 4 anos e fizeram muita falta nesses 2 na pós-graduação.

Aos técnicos do laboratório José Roberto Rodrigues da Silva (Beto), Eduardo Custódio (China) e Clarice Yoshiko Sibuya pelo suporte técnico nesse trabalho.

A toda a galera dos laboratórios agregados, sempre dispostos a ajudar e pelo agradável convívio. Gostaria de citar o Rodrigo Dalia e Luciele que me ajudaram na preparação da dieta e identificação do sexo dos animais quando recém nascidos, respectivamente.

Gostaria de agradecer o meu amigo prof. Dr. Cláudio Alexandre Gobatto, o qual sempre me orientou brilhantemente e parabenizar pelas conquistas alcançadas principalmente no ano de 2009, pois acredito que ele mais do que ninguém é merecedor. Ao seu modo sempre foi extremamente atencioso e sou muito agradecido pela consideração para com o meu trabalho, como nas muitas vezes que fomos até campinas para que o prof. Barreto nos auxiliasse na parte instrumental.

Ao meu amigo Gustavo Gomes de Araujo que desde a graduação como meu coorientador foi um grande parceiro nessa jornada e sempre foi uma pessoa na qual busquei me espelhar.

Ao meu amigo Wladimir Beck que foi quem mais me auxiliou durante a trabalhosa coleta de dados e também gostaria de parabenizá-lo pelo ingresso no mestrado.

Aos demais amigos e membros do LAFAE, Tam, Claudio Meireles, Pedro, Taísa, Glaucio, Luiz, Murilo e Manú, que de alguma maneira contribuíram para este trabalho de maneiras diferentes, seja com idéias ou apoio no dia a dia.

Aos companheiros de república que seguiram seus caminhos após a graduação e aos que continuam convivendo comigo atualmente.

Gostaria de fazer uma pequena homenagem aos animais que fizeram parte dessa pesquisa, espero que um dia mais pessoas reconheçam o valor da experimentação animal para o avanço científico.

Todos os meus primos e amigos que de alguma forma foram importantes e fazem parte da minha vida.

A minha família, meus tios, minhas tias e principalmente meu tio Adelmo e minha tia Joana, com destaque especial para a minha mãe e irmã que são as pessoas mais importantes pra mim.

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 O modelo de natação para ratos.....	13
2.2 O lactato e a máxima fase estável.....	14
2.3 O teste de MFEL adaptado à natação de ratos.....	15
2.4 A influência da densidade na natação.....	16
2.5 Determinação da composição corporal.....	17
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. OBJETIVOS.....	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Animais.....	21
5.2 Modelo experimental de indução da obesidade.....	21
5.3 Densitometria Corporal.....	22
5.4 Aparato para o nado atado de ratos.....	24
5.5 Determinação da máxima fase estável de lactato.....	26
5.6 Influência da densidade na natação.....	27
5.7 Índice de Lee.....	27
6. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	28
6.1 Coletas e análises sanguíneas.....	28
6.2 Perfil bioquímico do sangue.....	28
6.3 Composição química da carcaça.....	28
6.4 Tratamento estatístico.....	29
7. RESULTADOS.....	30
8. DISCUSSÃO.....	39
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
10. CONCLUSÕES.....	46
11. REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICES.....	53
APÊNDICE A – ARTIGO.....	54

RESUMO

No modelo de natação para ratos, a associação das intensidades de exercício determinadas por meio da lactacidemia com as suas respectivas sobrecargas são passíveis de crítica, uma vez que a quantificação dos pesos atados ao animal pode não representar efetivamente o esforço real do animal para sua manutenção na superfície da água, devido a esta metodologia sofrer influência da densidade corporal e dos padrões de nado apresentados pelos animais. O principal objetivo desse estudo foi desenvolver um modelo de natação atada para roedores o qual permitiu a determinação direta e em tempo real da força de nado realizada pelo animal e verificar a possível existência de diferentes padrões de nado. Além disso, foi feita a discriminação da densidade corporal em animais controles e induzidos à obesidade, com intuito de destacar consistentemente a influência da flutuabilidade na natação. Foram utilizados 24 *rattus norvegicus albinus*, machos, com 150 dias de idade, divididos em animais controles e induzidos à obesidade por meio da redução de ninhada somada a uma dieta hiperlipídica. Os animais tiveram a densidade corporal determinada por meio de um aparato de pesagem hidrostática utilizando um sistema de aquisição de dados. Posteriormente todos os ratos foram avaliados no teste de máxima fase estável de lactato adaptado para natação atada. Por meio do modelo experimental de indução a obesidade, foi possível induzir aumento significativo do peso e volume corporal, além da redução da densidade corporal dos animais no grupo obeso. As avaliações de animais controles e obesos revelaram a influência significativa da densidade corporal na determinação das intensidades de exercício, principalmente quando as cargas foram expressas em valores absolutos. Estudos que fazem uso do modelo de natação para ratos, principalmente de caráter longitudinal, com avaliações transversais ou estudos que fazem uso de intervenções que podem influenciar a composição corporal dos animais podem ter os resultados alterados caso não seja considerado o esforço individual para flutuação. A análise visual da cinética da força de nado permitiu evidenciar e caracterizar 4 padrões de nado bem distintos e especular sobre os motivos e implicações de suas incidências. O modelo de natação atada permitiu a determinação direta e em tempo real da força de nado realizada pelos animais, além de evidenciar a existência e de 4 diferentes padrões de nado e especular sobre as causas e conseqüências de suas incidências.

Palavras Chaves: modelo de natação para ratos, densidade corporal, máxima fase estável de lactato.

ABSTRACT

In the swimming model for rats, the association between the blood lactate concentration with the exercise intensity could be criticized once the workload quantification could not represent effectively the effort performed by the rat to keep himself on the surface, due to it be affected by the body density and the swimming patterns present by the animals. Thus, the mainly objective of this study was develop a apparatus for tethered swimming for rats, that allows the monitoring of swimming force during all exercise time and to verify the existence of different sorts of swimming patterns. 24 male *rattus novergicus albinus*, with 150 days of age were used, divided in control and obese induced animals by a nest reduction and hyper-lipid diet. All animals had their body density determined by hydrostatic weighing with an acquiring data device. Later the animals were evaluated in maximal lactate steady state test adapted to the tethered swimming. Was possible to induce significant weight and body volume increase in the obese group beside the reduction of the body density. The assessment of control and obese animals reveled significant body density influence in the workload determination, mainly when the workload was expressed in absolute values. Tethered swimming model allowed the investigation of statistic parameters of the data signal, which showed that the signal amplitude varied in function of the intensity, however the dispersion did not. Also the visual analyses of the force kinetic allowed the identification of 4 swimming patterns and the speculation about the reason and consequences of it incidence. Therefore animals that present such swimming patterns which can influence the assessment should be removed from the sample. Studies that make use of the swimming model for rats, mainly those of longitudinal duration or that make use of interventions that may change the animal's body composition, like diet, diseases or physical activity must be concerned about the individual effort to the fluctuation or is possible to do a wrong interpretation of the results.

Key words: swimming model for rats, body density and maximal lactate steady state.

Lista de Siglas

%PC – Por Cento do Peso Corporal

[La⁻] – Concentração de Lactato

DA – Densidade da Água

DC – Densidade Corporal

FN – Força de Nado

GC – Grupo Controle

GO – Grupo Obeso

GVT – Gordura Visceral Total

H₂O – Água

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

IL – Índice de Lee

IMC – Índice de Massa Corporal

iMFEL – Intensidade Individual de Máxima Fase Estável de Lactato

La⁻ – Lactato

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

MFEL – Máxima Fase Estável de Lactato

MG – Massa Gorda

MM – Massa Magra

MNR – Modelo de Natação para Ratos

MSG – Glutamato Monosódico

PC – Peso Corporal

PH – Peso Hidrostático

PN – Padrão de Nado

PNC – Padrão de Nado Contínuo

PNF – Padrão de Nado de Fuga

PNI – Padrão de Nado Intermitente

PNM – Padrão de Nado de Mergulho

Prot – Proteína

VC – Volume Corporal

1. INTRODUÇÃO

Uma vez que no modelo de natação para ratos (MNR) a sobrecarga adequada para um rato pequeno pode não representar o mesmo esforço relativo para um rato maior (SCHEER et al., 1947), a individualização da sobrecarga através da relativização pelo peso corporal (PC) é a metodologia mais utilizada (COX et al., 1985; DAWSON e HORVATH, 1970; HARRI e KUUSELA, 1986; FLAIM et al., 1979; GOBATTO et al., 1991 e 2001; LEBLANC et al., 1982; MCARDLE e MONTTOYE, 1966). Este parâmetro foi criado com a intenção de possibilitar uma prescrição individual de sobrecarga compatível com o potencial para o exercício de cada animal através de seu PC. Esse método é baseado no princípio de que a sobrecarga expressa em valor absoluto deve ser diretamente proporcional ao PC, considerando que animais maiores têm um maior potencial para o exercício. Porém, contrariando esse princípio, McArdle e Montoye (1976) observaram uma pequena correlação entre o aumento do PC e o decaimento do desempenho no tempo de esforço máximo para exaustão na natação de ratos. No entanto, esse estudo não levou em consideração fatores que podem influenciar na determinação da sobrecarga no MNR, como por exemplo a flutuação individual dos animais.

Resultados ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa (Apêndice A) demonstraram existir diferenças significativas entre os valores de densidade corporal (DC) de ratos de 3 idades diferentes (90, 120 e 210 dias). Dessa forma, foi possível demonstrar influência significativa da flutuabilidade sobre avaliação da capacidade aeróbia quando foram somadas as sobrecargas e os esforços individuais para flutuação, expressos em valor absoluto, entre os animais das faixas etárias utilizadas. Ainda, depois de “corrigidas” as diferenças de flutuabilidade entre os grupos, foram observadas correlações positivas ($r=0,71$ e $0,57$) significativas ($p<0,001$) para PC e DC, respectivamente, com os valores de sobrecarga absoluta. Estas evidências sustentam consistentemente os resultados encontrados por Scheer et al. (1947), que após homogeneizar a DC dos animais encontraram pequena correlação positiva de ambos, PC e DC, com o tempo de esforço máximo para exaustão em natação. Essas evidências contrariam a idéia de que o aumento do PC não é acompanhado proporcionalmente por um aumento do potencial para o exercício (McArdle e Montoye, 1966).

Além de sofrer influência da DC, a determinação da sobrecarga no MNR pode ser dependente de outros fatores, dentre eles os padrões de nado (PN) apresentados pelos animais,

que parecem divergir em 4 variações bem distintas e facilmente caracterizáveis. O padrão de nado contínuo (PNC) é o mais comum e é caracterizado pela permanência quase que invariável, exceto por pequenas oscilações, do animal na superfície da água, possibilitando manter o ciclo e frequência respiratórios normalmente. Já o padrão de nado em mergulho (PNM) se caracteriza pelo mergulho voluntário, claramente identificável, do animal em direção ao fundo do tanque, em busca por uma saída, permanecendo em apnéia por tempo considerável antes de retomar a superfície, o que prejudica a avaliação por questões metabólicas evidentes (MILLER e DARROW, 1941). Alguns animais apresentam ainda um padrão de nado em fuga (PNF) que se caracteriza pelo excesso de vigor na propulsão realizada pelo animal para permanência na superfície, comportamento apresentado geralmente nos primeiros minutos de exercício no qual o animal parece buscar um modo de fugir daquele meio. Desse modo, esse comportamento pode conduzir os ratos à fadiga ou exaustão precoce. Já o padrão de nado intermitente (PNI) é caracterizado por um nado de esforço intermitente, no qual o animal se permite afundar, para descansar passivamente por alguns segundos, e em seguida realiza um esforço necessário para voltar à superfície e respirar, alternando breves períodos de esforço e descanso passivo o que pode alterar a frequência do ciclo respiratório.

Portanto, o MNR é uma ferramenta simples para avaliação e treinamento de ratos, mas que apresenta uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos ao animal que tornam a quantificação da sobrecarga consideravelmente complexa. Desse modo, nosso grupo de pesquisas tem utilizado há muitos anos a concentração de lactato sanguínea como marcador fisiológico da intensidade de esforço em natação de ratos (GOBATTO et al. 1991) e camundongos, possibilitando realizar avaliações físicas confiáveis e precisas, muitas vezes sem a necessidade de condicionar os animais a realizarem esforços de tempo máximo para exaustão, como observado em estudos clássicos envolvendo tais espécies animais (MCARDLE e MONTTOYE, 1966; SCHEER et al., 1947). No entanto a associação das intensidades de exercício determinadas através da lactacidemia com as suas respectivas sobrecargas continuam passíveis de crítica, uma vez que a quantificação dos pesos atados ao animal pode ser imprecisa e não representar efetivamente o esforço real do animal para sua manutenção na superfície da água.

Mesmo sendo crescentes os estudos que verificam a influência do exercício de natação em modelos animais, pouco se sabe em relação à intensidade de esforço real realizada pelo rato, provavelmente por não se conhecer melhores métodos para prescrição da sobrecarga. Por esse

motivo, com a preocupação de diminuir erros sobre a determinação das sobrecargas associadas à intensidade de exercício, o principal objetivo desse estudo foi desenvolver um modelo de natação atada para roedores o qual permitiu a determinação direta e em tempo real da força de nado (FN) realizada pelo rato, bem como verificar a possível existência de diferentes PN através da análise cinética dos sinais de força em teste de máxima fase estável de lactato (MFEL) adaptado ao MNR por Gobatto et al. (2001). Além disso, foi feita a discriminação da DC, por meio de pesagens hidrostáticas, em animais controles e induzidos à obesidade por meio da redução de ninhada somada a uma dieta hiperlipídica, com intuito de destacar consistentemente a influência da flutuabilidade no MNR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *O modelo de natação para ratos (MNR)*

A natação pode ser utilizada para identificar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares frente ao estresse físico agudo e as adaptações causadas pelo treinamento crônico (BAAR et al., 2002; IEMITISU et al., 2002; JONES et al., 2003). No MNR foram observadas respostas orgânicas frente ao estresse físico semelhantes às encontradas em experimentos com humanos (DE ARAUJO et al., 2007; GOBATTO et al., 2001a e 2008; VOLTARELLI et al., 2002), revelando ser este um bom modelo alternativo na realização de estudos da fisiologia do esforço, especialmente por possibilitar investigações invasivas que seriam eticamente inviáveis se realizadas em seres humanos. O MNR tem como vantagens o baixo custo e complexidade deste “ergômetro” em relação à esteira, além da praticidade, uma vez que os ratos são nadadores inatos.

Alguns ratos podem nadar em água isotérmica (37° C) continuamente por até 60 horas antes de apresentar exaustão (KEY, 1962; RICHTER, 1957), mas sempre que necessário podem ser condicionados a realizarem menores períodos de atividade com a certeza de esforços vigorosos em função da necessidade de evitar o afogamento. Para isso, nos protocolos de natação para ratos, os animais, que nadam em sentido vertical, são submetidos ao exercício juntamente com sobrecargas (chumbo) atadas ao tórax (DE ARAUJO et al., 2007; GOBATTO et al., 2001a e 2008; VOLTARELLI et al., 2002) ou cauda (HARRIS e INGLE, 1940; MILLER e DARROW, 1941). Evidentemente, tal procedimento dificulta a permanência dos animais na superfície, o que permite quantificar diferentes intensidades de esforço e diminuir o tempo de exercício até a exaustão.

A padronização das dimensões do tanque, bem como da temperatura da água, são de extrema importância para a reprodutibilidade dos testes envolvendo o MNR. Devem ser utilizados tanques cilíndricos (sem quinas), de paredes lisas, com diâmetro amplo o suficiente para impedir que os animais se apoiem durante o nado, gerando assim boas condições para a observação da reprodutibilidade dos tempos de esforço até a exaustão (MCARDLE e MONTTOYE, 1966). Tanques de 50 cm de profundidade ou menores são inadequados (BARKER e HORVATH, 1964a; FLAIM et al., 1979; STUREK et al., 1984), pois permitem que os animais afundem e se apoiem no fundo para realizar saltos (MCARDLE e MONTTOYE, 1966). Para impedir esse comportamento, os tanques devem ter cerca de 100 cm de profundidade

(MCARDLE e MONTROYE, 1966) ou água em constante turbilhamento (FLAIM et al., 1979). Além da profundidade do tanque, a distância entre a superfície da água e a borda também deve ser grande o suficiente (~20 cm) para impedir que o animal se dependure. Os ratos devem nadar individualmente pois a natação coletiva (em grupo) induz os animais a apresentar um comportamento instintivo de agarrar e afundar uns aos outros na intenção de permanência à superfície, tornando o exercício desigual em termos da relação esforço/hipóxia e prejudicando a reprodutibilidade dos resultados (WILBER 1959; WILBER e HUNN 1960).

A temperatura da água também é um fator determinante para o desempenho no MNR (WILBER, 1957; BARKER e HORVATH, 1964; DAWSON e HORVATH, 1970; DAWSON et al., 1968 e 1970; HARRI e KUUSELA, 1986). Barker e Horvath, (1964b) observaram que ratos nadaram por pelo menos 45 minutos em água a temperatura termo neutra (37° C), sem modificação da temperatura retal dos animais (37° C), enquanto que ao nadarem em água a 20 e 42° C apresentaram exaustão em 12,6 e 14,1 minutos de exercício e uma temperatura retal de 26,9 e 42,6° C para a água fria e quente respectivamente. No entanto, apesar de atingir a exaustão antes ao nadarem em água quente e fria os ratos apresentaram um incremento do consumo de oxigênio similar aos primeiros minutos do teste em água termo neutra, indicando que o metabolismo ajustado em função do exercício não sofreu grande influência da temperatura corporal, apesar desta diminuir significativamente a duração da atividade. Wilber (1957) observou em porquinhos da índia (cobaias) que os animais mais pesados (1000g) nadam um período de tempo maior em temperaturas mais baixas do que 35° C em relação aos menos pesados (400g), que por sua vez conseguiram nadar por mais tempo em temperaturas mais altas que 35° C. Foi sugerido que animais maiores produzem mais calor e também possuem menor área de contato relativo ao peso para perder calor para água do que os menores. Além disso, animais que nadam em temperatura abaixo da termo neutra apresentam queda da temperatura retal acompanhada da diminuição do débito cardíaco abaixo dos valores de repouso (BAKER e HORVATH, 1964b). Por outro lado, o custo metabólico da natação parece requerer a manutenção do débito cardíaco acima dos valores de repouso (BAKER e HORVATH, 1964a).

2.2 O lactato e a máxima fase estável

Um estudo de Hill et al. (1924) propôs que o ácido láctico é produzido pelo metabolismo anaeróbio devido à falta de oxigênio para atender a demanda energética durante a contração

muscular. Essa foi com certeza a maior evidência utilizada para elaborar o conceito de limiar anaeróbio (KINDERMANN et al., 1979), limiar de lactato (HECK et al., 1985) ou ainda ponto de compensação respiratório, termo utilizado por Wasserman e McIlroi (1964) para explicar a elevada produção muscular e concentração de lactato ($[La^-]$) no sangue causada pela limitada fosforilação oxidativa durante o exercício. Dessa forma, o aumento desproporcional da $[La^-]$ em função do aumento da intensidade do exercício foi associada à transição metabólica na qual a predominância da contribuição energética para contração muscular passa de aeróbia para anaeróbia (KINDERMANN et al., 1979; HECK et al., 1985). Em 1985, Heck et al. observaram que independente da capacidade aeróbia do indivíduo a máxima fase estável de lactato (MFEL) ocorre numa $[La^-]$ média de 4,0 mM.

A MFEL é considerada a mais alta intensidade de exercício na qual existe equilíbrio entre a produção e a remoção de lactato (La^-) do sangue, e a $[La^-]$ sanguínea nesse estado representa a interdependência do metabólito à carga de trabalho (intensidade) observada (LAFONTAINE et al., 1981; BENEKE, 1995). Por definição a MFEL é atingida quando a $[La^-]$ no sangue varia menos de 1mM durante pelo menos 20 minutos da mais alta intensidade constantemente realizada (MADER e HECK et al., 1986).

Nas últimas décadas, evidências apontam contra a idéia de que a produção de ácido láctico necessariamente indique a condição de disoxia (RICHARDSON et al., 1998), termo utilizado para designar o *turnover* limitado de oxigênio no citocromo (CONNETT et al., 1968), durante exercício submáximo. Assim, foram introduzidas as teorias dos lançadores de lactato (BROOKS, 1985) e dos lançadores de lactato intra e entre células (BROOKS, 2000).

2.3 O teste de MFEL adaptado à natação de ratos

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa, Gobatto et al. (1991) realizaram testes incrementais de natação submetendo um grupo de ratos a 4 esforços com duração de 5 minutos e intensidades de 0, 5, 8 e 13 por cento do peso corporal (%PC). Após cada estágio, amostras sanguíneas foram coletadas para determinação da $[La^-]$ sanguínea. No entanto não foi verificado o comportamento clássico bi-exponencial de aumento abrupto da lactacidemia nesse ergômetro utilizando esse protocolo.

Posteriormente, Gobatto et al. (2001a) adaptaram o teste de MFEL proposto por Heck et al. (1985) para a natação de ratos. Para isso, os animais realizaram 20 minutos de esforços

contínuos suportando cargas correspondentes a 5, 6, 7, 8, 9 e 10 %PC, atadas ao dorso, com coletas sanguíneas sendo realizadas a cada 5 minutos, da extremidade distal da cauda dos animais, para posterior determinação da lactacidemia. A carga de MFEL individual foi considerada como a mais alta intensidade de exercício na qual o aumento da lactacidemia foi igual ou inferior à 1mmol/L, do 10° ao 20° minuto de esforço. Dessa forma foi estabelecido que, para ratos *Wistar* machos e sedentários, de aproximadamente 140 dias, cargas inferiores a 6 %PC podem ser consideradas aeróbias. Se utilizarmos o conceito de limiar anaeróbio, para esse tipo de exercício em ratos, tais intensidades podem ser consideradas "sub-limiais". Sendo assim, a utilização dessas intensidades, no treinamento físico de ratos, passou a ser referência quando o objetivo é o ganho da aptidão aeróbia. Entretanto, a maior contribuição do trabalho foi a determinação da mais alta concentração estável da lactacidemia para essas cargas, com valor de 5,5 mM. Após 9 semanas de treinamento aeróbio (intensidade de MFEL) a MFEL, observada nos mesmos animais, manteve-se nas mesmas concentrações sanguíneas de lactato (5,5 mM), porém com uma sobrecarga de 8 %PC. Esses resultados sugerem que a sobrecarga de MFEL aumentou ao final do período de treinamento, mas a $[La^-]$ de MFEL manteve-se constante. Em um artigo de revisão, Billat et al. (2003) cita tais dados como representativos para estudos com animais, porém controversos a outro obtido com ciclistas e sugere a necessidade de mais investigações envolvendo respostas da MFEL frente ao treinamento físico, uma vez que apenas esses dois estudos empenharam esforços nesse sentido.

2.4 A influência da densidade na natação

Voltarelli et al. (2003) adaptaram o teste de lactato mínimo, proposto inicialmente por Tegtbur et al. (1993), a ratas obesas tratadas com glutamato monossódico (MSG) e determinaram a capacidade aeróbia de maneira individualizada em natação. Esses autores verificaram que supostamente para uma mesma intensidade relativa de exercício os animais obesos realizaram menor esforço em relação ao grupo controle. Em estudo semelhante, Araujo et al. (2009) determinaram a MFEL em ratos normais e obesos de ambos os gêneros e encontraram nos grupos obesos maior sobrecarga relativa ao PC associada à intensidade de MFEL em relação aos respectivos grupos controles. Isso pode ser atribuído, em parte, pela menor DC apresentada pelo grupo obeso, permitindo maior flutuação durante o exercício da natação. Gobatto et al. (2002) verificaram em ratos obesos (MSG), treinados e sedentários, que o esforço relativo a 5 %PC não

foi equivalente à dos grupos controles treinado e sedentário. O mesmo resultado foi observado por Mello et al. (2001) que encontraram menor $[La^-]$ para o grupo obeso sedentário e atribuíram isto a maior fluabilidade dos animais desse grupo devido à maior quantidade de gordura visceral. Logo, a determinação da intensidade de esforço relativa à %PC total aparece como uma limitação em estudos do MNR, principalmente quando o estudo envolve animais obesos.

Tal método de prescrição da sobrecarga pode ser passível de imprecisão uma vez que não são levados em consideração fatores que podem ser relevantes na natação, como a DC do animal. Desse modo, é possível que ratos com maior quantidade de tecido adiposo possuam uma menor densidade, facilitando sua flutuação e implicando em uma menor intensidade de trabalho em relação a animais com mais massa corporal magra.

2.5 Determinação da composição corporal

Os métodos diretos de determinação da composição corporal são os mais precisos e incluem a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a dissecação de cadáveres. Porém, necessitam de aparelhos de custo elevado ou implicam em muitos problemas de ordem ética e legal para aquisição de cadáveres. O uso de modelos animais permite a avaliação direta da composição corporal (FEYDER, 1935; FRISCH et al., 1977) através da análise da composição química da carcaça (LOWRY et al., 1951; CECCHI, 1999). Dessa forma, esses métodos implicam no sacrifício do animal sendo inviáveis ou precisando de uma grande quantidade de animais para realização de estudos que necessitam de um acompanhamento longitudinal.

Métodos indiretos para estimativa do percentual de gordura corporal, em animais, incluem o uso de medidas corporais como peso e comprimento (BERNARDIS e PETTERSON, 1968), extrapolação da gordura corporal através de depósitos específicos (GREWAL et al., 1973) e quantidade de água corporal (KODAMA, 1971). Também existem métodos que são considerados duplamente indiretos os quais por meio de equações de regressão tentam prever variáveis associadas aos procedimentos indiretos para enfim poder estimar parâmetros da composição corporal. Dentre eles, podemos citar a impedância bioelétrica, que está baseada no princípio de que a condução elétrica no organismo é facilitada através do tecido hidratado e da água extracelular em comparação com o tecido adiposo (LUKASKI et al., 1986; ROMÁN et al., 1999), e a técnica antropométrica que através das medidas de perímetros, diâmetros e espessuras de dobras cutâneas, tem sido um recurso bastante utilizado para prever, ou estimar o percentual

de gordura corporal através de equações (FORSYTH e SINNING, 1973). As vantagens que a técnica antropométrica apresenta em relação a outros métodos, são material simples, o baixo custo financeiro dos equipamentos, praticidade, rapidez na coleta dos dados, aplicabilidade em grandes grupos, boa relação com a DC e por ser um método não invasivo (BEHNKE e WILMORE, 1974; LOHMAN, 1992). No entanto, esses métodos não são muito precisos, especialmente se o percentual de gordura for baixo (DAHMS e GLASS, 1982).

A densitometria é um método indireto para a determinação da composição corporal que é freqüentemente utilizado para validar outros métodos (BUSKIRK, 1961). A densidade ou gravidade específica é uma grandeza física que expressa a razão entre a massa e o volume de determinada matéria quando comparada à outra tida como referência, geralmente a água. Usada como parâmetro biológico, a DC pode ser utilizada para evidenciar a composição corporal em animais (DAHMS e GLASS, 1982) e humanos (BEHNKE e WILMORE, 1974), uma vez que é inversamente proporcional ao percentual de gordura corporal (KODAMA, 1971) e diretamente proporcional à massa magra. Os métodos encontrados na literatura para mensuração do volume corporal (VC) em humanos e pequenos animais incluem deslocamento de ar (GNAEDINGER, 1962; KODAMA e PACE, 1963; HIX et al., 1964), diluição de hélio (WALSER e STEIN, 1953; SIRI, 1955) e pesagem hidrostática (RATHBUN e PACE, 1945; KODAMA, 1971; STONE et al., 1978; ROGERS e WEBB, 1980; DAHMS e GLASS, 1982; HOHL et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA

Nesse estudo foi desenvolvida uma nova linha de investigação para o MNR. Trata-se de um nado atado para ratos, através do qual foi possível aperfeiçoar a avaliação, tanto em termos de sensibilidade, quanto de investigar novos parâmetros associados à natação animal. Nesse modelo os animais nadaram atados, através de uma corda elástica, e conectados a um sistema de aquisição de sinais (*strain gage*, módulo de aquisição de sinais - National Instruments®, computador e software – Labview®) que permitiu a monitoração em tempo real da FN realizada pelo rato durante toda a duração do esforço. Ainda, o novo aparato foi utilizado na avaliação da MFEL de ratos controles e induzidos à obesidade por meio da redução de ninhada somado a uma dieta hiperlipídica, para determinar por meio de pesagens hidrostáticas a influência da DC na FN. Dessa forma, é esperado que o novo modelo de determinação da FN forneça uma prescrição de intensidade individual mais precisa e confiável, refletindo em resultados mais esclarecedores na fisiologia do exercício experimental.

4. OBJETIVOS

- Desenvolver um aparato para a realização do nado atado de ratos.
- Avaliar a capacidade aeróbia (teste de máxima fase estável de lactato) e monitorar em tempo real (numa frequência de 1000hz) a força de nado durante o esforço dos animais controles e obesos.
- Verificar a influência da densidade corporal na natação de animais obesos.
- Investigar características de padrão de nado e da força de nado dos animais em diferentes intensidades (inferior, equivalente e superior a máxima fase estável de lactato).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 10 *rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, fêmeas, com aproximadamente 80 dias de idade, prenhas, providas do biotério central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Botucatu. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em ambiente fechado em caixas de polietileno (1 caixa para cada fêmea e sua prole ou, no máximo, 5 ratos após o desmame), temperatura ambiente aproximada de 25 ± 2 °C e ciclo invertido de luz claro/escuro de 12/12 horas. Os ratos receberam ração comercial (Labina-Purina®) e água “*ad libitum*” durante o período pré e pós-natal.

Todos os animais foram adaptados ao meio líquido, 5 dias/semana, durante 3 semanas antes do início dos testes. A temperatura da água tanto na adaptação quanto nos dias de testes foi mantida a 31 ± 1 °C (DAWSON e HORVATH, 1970; HARRI & KUUSELA, 1986).

5.2 Modelo experimental de indução da obesidade

Para indução da obesidade pós-natal, foi utilizada a combinação do método de redução da ninhada (FIOROTTO et al., 1991) junto com a dieta hiperlipídica, segundo YUN et al. (2008).

Ao nascimento, no grupo obeso (GO) as proles foram reduzidas a no máximo 4 filhotes por ninhada, enquanto que no grupo controle (GC) foram mantidos de 8 a 12 filhotes por ninhada para nutrição normal dos filhotes. A conseqüente superalimentação dos filhotes do GO resulta em aumento na produção lipídica no fígado, estimulação da atividade de enzimas lipogênicas no adipócito, aumento da insulina e do triacilgliceról plasmáticos, persistente hiperfagia e obesidade após o desmame (FIOROTTO et al., 1991). Imediatamente após 21 dias do nascimento, os filhotes foram separados das fêmeas e alimentados com ração comercial (Labina-Purina®) até 150 dias de idade, com exceção dos animais do GO que foram alimentados com dieta hiperlipídica (YUN et al., 2008) a partir dos 90 até os 150 dias de idades (figura 1).

Figura 1. Desenho do modelo experimental para indução da obesidade.

Ao atingirem 150 dias de idade, foram selecionados aleatoriamente 12 animais obesos e 12 animais controles para os grupos GO e GC respectivamente, totalizando 24 animais que participaram do estudo envolvendo o exercício.

5.3 Densitometria Corporal

O VC dos animais foi determinado por meio de pesagens hidrostáticas, realizadas com um sistema construído especialmente para modelo animal. Esse método baseia-se no princípio de Arquimedes: “Um corpo imerso em um líquido sofre ação de uma força hidrostática de flutuabilidade, que é evidenciada por uma diferença de peso equivalente ao peso do líquido deslocado”.

Como parte do aparato, foi utilizado um sistema de aquisição de sinais, que permitiu a captura das pesagens numa frequência de 1000 hz e foi composto de célula de carga (MK controle e instrumentação[®], modelo: MKPW-2), um amplificador para o sinal, módulo de acondicionamento do sinal (National Instruments[®] USB 6008) e software de aquisição (Labview Signal Express[®] 2.0). Além disso, também foi utilizado um aquário de vidro (40x40x50 cm) e um sistema de suporte regulável do animal, que permite que apenas o focinho fique fora d’água durante a pesagem hidrostática (figura 2).

Os ratos foram sedados por meio da inalação de éter etílico com intuito de diminuir o estresse do animal e principalmente evitar sua movimentação durante a determinação do peso hidrostático (PH). Antes da pesagem hidrostática os animais tiveram seus corpos encharcados e agitados em água para retirada das bolhas de ar presas ao pelo e em seguida foram pendurados pelos dentes superiores por meio do suporte conectado a célula de carga (figura 2).

<http://www.youtube.com/watch?v=f2b-ptSWw30>

Figura 2. Aparato para pesagem hidrostática e sistema de suporte regulável do animal.

Para cada animal, foram capturados 30 segundos de valores de pesagem a uma frequência de 1000 hz e filtrado o pico máximo do sinal dentro de cada segundo (1000 pontos), que corresponde ao momento no qual o animal realizara a expiração e possuía menor resíduo de ar nos pulmões (figura 3). O PH de cada rato foi calculado pela média dos 30 picos máximos filtrados a partir dos 30 segundos de sinal.

Figura 3. Cinética do sinal durante a pesagem hidrostática, capturada diretamente da interface gráfica do software.

A equação para a determinação do VC, proposta por Behnke (1974) para humanos, adaptada ao modelo animal está apresentada abaixo. Nela, o volume corporal (VC) é igual à diferença entre ao peso corporal (PC) e o peso hidrostático (PH), divididos pela densidade da água (DA) (equação 1).

$$VC = \frac{(PC-PH)}{DA}$$

Equação 1. Volume Corporal.

Os valores de densidade corporal (DC) dos animais foram obtidos pela razão entre o peso corporal (PC) e o volume corporal (VC) (equação 2).

$$DC = \frac{PC}{VC}$$

Equação 2. Densidade Corporal

5.4 Aparato para o nado atado de ratos

No nado atado (figura 4), os animais foram atados por meio de um colete de velcro, conectado a um elástico de látex (10 cm), amarrado a um fio de micro-filamento (marca Ottoni[®], modelo Platinum XT) totalmente flexível e não elástico. O fio de micro-filamento é conduzido por duas polias em série, de forma que tracione a animal para baixo, e conectado à célula de carga. A imposição da sobrecarga associada à intensidade de exercício foi feita por meio da tração aplicada no fio de micro-filamento, regulada por um mecanismo que determina altura da posição da célula de carga. Dessa forma, foi utilizado um sistema de aquisição de sinais, ajustado de modo que a tensão gerada pelo esforço dos animais para se manterem na superfície da água fosse mensurada em tempo real, durante todo o teste, numa frequência de 1000 hz. O sistema de aquisição de sinais foi composto de célula de carga (MK controle e instrumentação[®], modelo: MKPW-2) como elemento sensor primário, um amplificador para o sinal, módulo de condicionamento do sinal (National Instruments[®] USB 6008) e software (Labview Signal Express[®] 2.0).

<http://www.youtube.com/watch?v=kbpvJLXq8XI>

Figura 4. Aparato para o nado atado de ratos.

A calibração do sistema de aquisição de sinais foi feita com 12 cargas de chumbo de peso (g) conhecido (figura 5A). Depois de armazenados, os valores de sinal obtidos (strain) foram convertidos em unidades de força (g) por meio da aplicação da equação de calibração derivada da regressão linear entre os valores do sinal (strain) e peso (g). Também foi realizada a calibração do sistema de polias por meio de tubos de ensaio emborcados dentro do tanque com água, demonstrando a linearidade do sistema (figura 5B).

Figura 5. Calibração do sistema de aquisição de sinais

Desse modo, os pontos foram filtrados em média por segundo (a cada 1000 pontos) e a FN foi calculada por meio da média do tempo total do sinal. Além disso, foram determinados os desvios padrões, picos máximos e mínimos dentro de cada segundo, sendo apresentada a média do tempo total de nado.

5.5 Determinação da máxima fase estável de lactato

Os animais realizaram de 3 a 5 esforços retangulares randômicos de 30 minutos, gerando uma FN, para se manterem na superfície da água, equivalente à cargas de 2 a 7 %PC, distribuídas em seqüência aleatória, nunca repetidas para o mesmo rato e com intervalo de 24 horas entre duas cargas diferentes. Foram feitas coletas de sangue da extremidade distal da cauda em repouso, no 10º e 30º minuto de exercício para determinação da lactacidemia. Os ratos nadaram individualmente (WILBER 1959; WILBER e HUNN 1960) em um tanque cilíndrico, com 25 cm de diâmetro e cerca de 1m de profundidade. Foi usado como parâmetro para exaustão a permanência do animal sob a superfície por mais de 10 segundos (MCARDLE e MONTTOYE, 1966; SCHEER et al., 1947). A intensidade individual de máxima fase estável de lactato (iMFEL) será considerada aquela que apresentar a maior sobrecarga durante o exercício constante na qual a entrada do La^- na circulação igualar a remoção, com uma variação sanguínea menor que 1 mM de La^- , do 10º ao 30º minuto de exercício (BILLAT et al., 2003; GOBETTO et al., 2001a; MADER e HECK, 1986).

5.6 Influência da densidade na natação

O PH individual é um parâmetro dependente da DC que representa o esforço “inato” que cada animal realiza para manter-se na superfície da água independente de nenhum tipo de sobrecarga. Determinar o PH é equivalente a quantificar esforço individual para a flutuação. Dessa forma, o esforço individual real de cada rato é a soma entre a iMFEL (descrita acima) e seu peso hidrostático (iMFEL+PH). Diferente do modelo convencional que quantifica apenas a sobrecarga associada à iMFEL, ignorando a influência da flutuação do animal. Ao somar o PH foi “criado” um novo parâmetro de sobrecarga que discrimina a DC.

5.7 Índice de Lee

O índice de Lee (IL) foi calculado para todos os animais pela razão entre a raiz cúbica do PC em gramas (g) pelo comprimento focinho-ânus em centímetros (cm) (Bernardis e Petterson, 1968). Esse índice, proposto para animais (figura 6), é equivalente ao índice de massa corporal (IMC) obtido para humanos (Bernardis & Petterson, 1968).

Figura 6. Índice de Lee.

6. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

6.1 *Coletas e análises sanguíneas*

Durante o teste de MFEL, por pequena seção distal da cauda dos animais, foram obtidas amostras de sangue de 25 μL , com auxílio de tubo capilar pré-calibrado e heparinizado, armazenadas em tubos eppendorf, contendo 400 μL de uma solução de HClO_4 (4%) para desproteinização do sangue. Posteriormente a amostra foi agitada e centrifugada, para a retirada de 100 μL do sobrenadante, transferido para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 500 μL de reativo preparado à base de estoque de glicina/EDTA e hidrazina-hidrato 1,2 mL, 100 mg de NAD (*Beta-nicotinamide dinucleotide* SIGMA) e 150 μL de LDH (*L-Lactic dehydrogenase bovine heart*) - 100 unidades/mL SIGMA) a pH 8,85. As amostras foram agitadas e incubadas durante 60 min a temperatura ambiente. As concentrações de lactato foram medidas a 340 nm contra a curva de calibração L-Lactato (ENGELS & JONES, 1978).

6.2 *Perfil bioquímico do sangue*

Para verificação dos efeitos a nível fisiológico do modelo experimental de indução da obesidade, os teores séricos de lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total, colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL) e à lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram determinados por métodos colorimétricos, conforme descrito por Nogueira e Strufaldi et al. (1990).

6.3 *Composição química da carcaça*

Após sacrifício, as carcaças foram evisceradas, pesadas e desidratadas até peso constante em estufa a 100°C, sendo então homogeneizadas em liquidificador com benzeno, sofrendo várias lavagens com esse solvente para a remoção da gordura. A carcaça livre de gordura foi novamente seca até peso constante em estufa a 100°C. O pó seco e desengordurado foi pesado. O conteúdo de água (H_2O) e de gordura da carcaça, massa gorda (MG), foi calculado por diferença de peso (WATERLOW e MENDES, 1975). Uma alíquota do pó desengordurado, massa magra (MM), foi dissolvida em HClO_4 1N e o teor de proteína (Prot) foi medido pelo método folin-fenol (LOWRY et al., 1951). Ainda, os tecidos adiposos mesentérico, retro-peritoneal e epididimal

foram totalmente removidos e pesados, os valores foram somados para determinação da gordura visceral total (GVT).

6.4 *Tratamento estatístico*

Foi utilizado o software Statistica 7.0[®] (StatSoft) para tratamento estatístico e os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Todos os dados apresentaram distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilks. Foi utilizado o teste t de *student* para amostras independentes com $p < 0,05$ máximo para significância entre os grupos. Para verificar a associação entre todos os parâmetros foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Para verificar a variância entre as variáveis estatísticas do sinal de força nas 3 diferentes intensidades (inferior, equivalente e superior a MFEL) foi utilizado o teste ANOVA One-Way e quando necessário o Post-hoc de Scheffé.

7. RESULTADOS

Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para os valores dos parâmetros somáticos (tabela 1).

Tabela 1. Valores de peso corporal (PC), índice de Lee (IL), peso hidrostático (PH), volume corporal (VC) e densidade corporal (DC) para os grupos controle e obeso.

Grupo	PC (g)	IL (g ^{0.33} /cm)	PH (g)	VC (cm ³)	DC (g/cm ³)
Controle	471±42	0,32±0,01	17,79±4,6	455±43	1,0302±0,0104
Obeso	555±72*	0,33±0,01 [♦]	13,62±3,3 [•]	526±50*	1,0179±0,0059*

Diferença significativa para: *GC (p<0,001), [♦]GC (p<0,01), [•]GC (p<0,05).

Apenas os parâmetros de composição química da carcaça associados a lipídeos apresentaram diferença significativa entre os grupos (tabela 2).

Tabela 2. Valores absolutos (g) dos parâmetros de composição química da carcaça: gordura visceral total (GVT), massa magra (MM), massa gorda (MG), água (H₂O) e proteína (Prot) para os grupos controle e obeso.

Grupo	GVT (g)	MM (g)	MG (g)	H ₂ O (g)	Prot (g)
Controle	9,1±3,5	100,8±16,9	33,4±7,2	238,6±21,9	91,4±15
Obeso	23,9±5,4*	103,2±8,9	64,5±8,3*	246,5±16,9	90,7±19,9

Diferença significativa para: *GC (p<0,001).

Exceto pela proteína total, todos os parâmetros de composição química da carcaça quando expressos em valores relativos ao peso total da carcaça apresentaram diferenças significativas entre os grupos (tabela 3).

Tabela 3. Valores relativos ao peso total da carcaça (%PC) dos parâmetros: gordura visceral total (GVT), massa magra (MM), massa gorda (MG), água (H₂O) e proteína (Prot) para os grupos controle e obeso.

Grupo	GVT (%PC)	MM (%PC)	MG (%PC)	H ₂ O (%PC)	Prot (%PC)
Controle	1,9±0,6	26,9±1,6	9±1,8	64,1±1,6	24,6±3,6
Obeso	4,4±0,7*	24,9±1,2 [•]	15,6±2*	59,5±1,5*	21,9±4,8

Diferença significativa para: *GC (p<0,001), [•]GC (p<0,05).

O GO apresentou significativamente os maiores e menores valores de concentração de colesterol e LDH respectivamente, não sendo observadas diferenças aos demais parâmetros (tabela 4).

Tabela 4. Valores séricos de triglicerídeos (TG), Colesterol (COL), HDL, LDL e lipídeos totais (LT).

Grupo	TG (mg/dl)	COL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	LT (mg/dl)
Controle	112±49	75±13	50±7	80±9	323±75
Obeso	135±34	100±28 [♦]	51±11	64±12*	350±82

Diferença significativa para: *GC (p<0,001) e [♦]GC (p<0,01).

As concentrações médias de lactato sanguíneo durante a iMFEL foram de 3,67±0,98 e 2,82±1,30 mM para o GC (figura 7A) e GO (figura 7B), respectivamente, e não foram significativamente diferentes (p<0,05) entre os grupos.

Figura 7. Máxima concentração estável de lactato para os grupos controle (A) e obeso (B).

As cargas de iMFEL expressas em valores absolutos (g) foram de $15,41 \pm 3,57$ e $20,58 \pm 2,23^*$ enquanto as cargas de iMFEL+PH foram de $32,27 \pm 6,21$ e $34,2 \pm 7,6$ g para GC e GO respectivamente (figura 8A). As cargas de iMFEL expressas em valores relativos aos pesos corporais (%PC) foram de $3,26 \pm 0,69$ e $3,82 \pm 0,59$ enquanto as cargas de iMFEL+PH foram de $6,96 \pm 1,27$ e $6,34 \pm 0,81$ %PC para GC e GO, respectivamente (figura 8B). As cargas de iMFEL expressas em valores relativos aos pesos hidrostáticos (%PH) foram de 93 ± 26 e $162 \pm 55^*$ enquanto as cargas de iMFEL+PH foram de 193 ± 26 e $262 \pm 55^*$ %PH para GC e GO respectivamente (figura 8C).

Figura 8. Cargas de iMFEL e iMFEL+PH expressas em valores absolutos (g) e relativos aos pesos corporal (%PC) e hidrostático (%PH). Diferença significativa de: *GC ($p < 0,001$) e #GC ($p < 0,005$).

Os valores para as correlações de Pearson realizadas entre os parâmetros somáticos de animais de ambos os grupos estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Correlação de Pearson entre os parâmetros somáticos: peso corporal (PC), índice de Lee (IL), peso hidrostático (PH), volume corporal (VC) e densidade corporal (DC).

	PC (g)	IL (g^{0.33}/cm)	PH (g)	VC (cm³)	DC (g/cm³)
PC		0,56	-0,11	1,00*	-0,45*
IL	0,56		-0,06	0,56	-0,22
PH	-0,11	-0,06		-0,18	0,93*
VC	1,00*	0,56	-0,18		-0,51*

Correlação significativa para: *p<0,001; *p<0,01 e *p<0,05.

Os valores para as correlações de Pearson realizadas entre os parâmetros de composição química da carcaça de animais de ambos os grupos estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6. Correlação de Pearson entre os parâmetros de composição química da carcaça: gordura visceral total (GVT), água (H2O), massa gorda (MG) e proteína (Prot), em valores absolutos (g) e relativos aos pesos das carcaças (%PC).

	GVT (g)	H2O (g)	MG (g)	Prot (g)	GVT (%PC)	H2O (%PC)	MG (%PC)	Prot (%PC)
GVT (g)		0,46	0,91*	0,13	0,99*	-0,91*	0,83*	-0,26
H2O (g)	0,46		0,21	0,30	0,35	-0,20	0,01	-0,13
MG (g)	0,91*	0,21		0,17	0,93*	-0,94*	0,98*	-0,14
Prot (g)	0,13	0,30	0,17		0,10	-0,09	0,12	0,88*
GVT (%PC)	0,99*	0,35	0,93*	0,10		-0,94*	0,88*	-0,27
H2O (%PC)	-0,91*	-0,20	-0,94*	-0,09	-0,94*		-0,92*	0,23
MG (%PC)	0,83*	0,01	0,98*	0,12	0,88*	-0,92*		-0,11

Correlação significativa para: *p<0,001.

Os valores para as correlações de Pearson realizadas entre as cargas de iMFEL e iMFEL+PH em valores absolutos (g), relativos aos pesos corporal (%PC) e hidrostático (%PH) de animais de ambos os grupos estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7. Correlação de Pearson entre e as cargas de iMFEL e iMFEL+PH em valores absolutos (g), relativos aos pesos corporal (%PC) e hidrostático (%PH).

	iMFEL (g)	iMFEL (%PC)	iMFEL (%PH)	iMFEL+PH (g)	iMFEL+PH (%PC)	iMFEL+PH (%PH)
iMFEL (g)		0,86 [*]	0,77 [*]	0,48 [•]	0,07	0,77 [*]
iMFEL (%PC)	0,86 [*]		0,60 [#]	0,47 [•]	0,39	0,60 [#]
iMFEL (%PH)	0,77 [*]	0,60 [#]		-0,12	-0,40	1,00 [*]
iMFEL+PH (g)	0,48 [•]	0,47 [•]	-0,12		0,76 [*]	-0,12
iMFEL+PH(%PC)	0,07	0,39	-0,40	0,76 [*]		-0,40

Correlação significativa para: ^{*}p<0,001; [#]p<0,005; [•]p<0,05.

Os valores para as correlações de Pearson realizadas entre os parâmetros somáticos e os parâmetros de composição química da carcaça de animais de ambos os grupos estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Correlação de Pearson entre os parâmetros somáticos: peso corporal (PC), índice de Lee (IL), peso hidrostático (PH), volume corporal (VC), densidade corporal (DC) e os parâmetros químicos de composição da carcaça: gordura visceral total (GVT), água (H₂O), massa gorda (MG), proteína (Prot) em valores absolutos (g) e relativos aos pesos das carcaças (%PC).

	PC (g)	IL (g^{0.33}/cm)	PH (g)	VC (cm³)	DC (g/cm³)
GVT (g)	0,83 [*]	0,55	-0,50 [♦]	0,86 [*]	-0,71 [*]
H₂O (g)	0,84 [*]	0,34	0,16	0,82 [*]	-0,22
MG (g)	0,68 [#]	0,48	-0,49	0,71 [#]	-0,67 [#]
Prot (g)	0,26	0,05	0,01	0,26	-0,12
GVT (%PC)	0,75 [*]	0,51	-0,55 [#]	0,78 [*]	-0,74 [*]
H₂O (%PC)	-0,68 [#]	-0,60	0,47	-0,70 [#]	0,66 [♦]
MG (%PC)	0,52 [•]	0,41	-0,54 [•]	0,55 [•]	-0,64 [♦]
Prot (%PC)	-0,22	-0,21	0,05	-0,22	0,11

Correlação significativa para: ^{*}p<0,001; [#]p<0,005; [♦]p<0,01; [•]p<0,05.

Os valores para as correlações de Pearson realizadas entre os parâmetros somáticos e as cargas de iMFEL e iMFEL+PH em valores absolutos (g), relativos aos pesos corporal (%PC) e hidrostático (%PH) de animais de ambos os grupos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Correlação de Pearson entre os parâmetros somáticos: peso corporal (PC), índice de Lee (IL), peso hidrostático (PH), volume corporal (VC), densidade corporal (DC) e as cargas de iMFEL e iMFEL+PH em valores absolutos (g), relativos aos pesos corporal (%PC) e hidrostático (%PH).

	PC (g)	IL (g^{0.33}/cm)	PH (g)	VC (cm³)	DC (g/cm³)
iMFEL (g)	0,47 [•]	0,07	-0,38	0,49 [•]	-0,50 [•]
iMFEL (%PC)	-0,01	-0,25	-0,27	0,00	-0,25
iMFEL (%PH)	0,40	0,33	-0,81 [*]	0,45 [•]	-0,82 [*]
iMFEL+PH (g)	0,21	-0,13	0,63 [#]	0,16	0,47 [•]
iMFEL+PH (%PC)	-0,47 [•]	-0,46	0,73 [*]	-0,51 [•]	0,79 [*]
iMFEL+PH (%PH)	0,40	0,33	-0,81 [*]	0,45 [•]	-0,82 [*]

Correlação significativa para: ^{*}p<0,001; [#]p<0,005; [•]p<0,05.

As correlações de Pearson realizadas entre os parâmetros de composição química da carcaça e as cargas de iMFEL e iMFEL+PH em valores absolutos (g), relativos aos pesos corporal (%PC) e hidrostático (%PH) de animais de ambos os grupos estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10. Correlação de Pearson entre os parâmetros de composição química da carcaça: gordura visceral total (GVT), água (H₂O), massa gorda (MG), proteína (Prot) e as cargas de iMFEL e iMFEL+PH em valores absolutos (g), relativos aos pesos corporal (%PC) e hidrostático (%PH).

	GVT (g)	H ₂ O (g)	MG (g)	Prot (g)	GVT (%PC)	H ₂ O (%PC)	MG (%PC)	Prot (%PC)
iMFEL (g)	0,63 [#]	0,35	0,55	-0,43	0,67 [*]	-0,53	0,55	-0,77 [♦]
iMFEL (%PC)	0,22	-0,01	0,16	-0,64 [♦]	0,31	-0,21	0,21	-0,73 [♦]
iMFEL (%PH)	0,68 [*]	0,08	0,57	-0,59	0,72 [*]	-0,64 [♦]	0,63 [♦]	-0,81 [#]
iMFEL+PH (g)	0,06	0,31	0,18	-0,08	0,03	-0,13	0,14	-0,29
iMFEL+PH (%PC)	-0,53 [♦]	-0,35	-0,50	-0,31	-0,50 [♦]	0,44	-0,47	-0,06
iMFEL+PH (%PH)	0,68 [*]	0,08	0,57	-0,59	0,72 [*]	-0,64 [♦]	0,63 [♦]	-0,81 [#]

Correlação significativa para: ^{*}p<0,001; [#]p<0,005; [♦]p<0,01; [•]p<0,05.

A figura 9 apresenta o gráfico (n=11, 5 animais controles e 6 animais obesos) da média dos picos mínimos (A), desvios padrões (B) e picos máximos (C) de força em cada segundo de exercício em intensidade 20% abaixo (Sub-iMFEL), equivalente (iMFEL) e 20% acima (Supra-iMFEL) da iMFEL, expressos em valores relativos as forças médias (%FM) de cada intensidade.

Figura 9. Média do total dos picos mínimos (A), desvios padrões (B) e dos picos máximos (C) de força de cada segundo de exercício em intensidade inferior (Sub-iMFEL), equivalente (iMFEL) e superior (Supra-iMFEL) a iMFEL, expressos em valores relativos as forças médias (%FM) da respectiva intensidade. Diferença significativa para: [#]Sub-iMFEL p<0,005; [♦]Sub-iMFEL (p<0,05).

A figura 10 apresenta o gráfico (n=11) para o 1º quartil (A), mediana (B) e 3º quartil (C) para a intensidade inferior, equivalente e superior a iMFEL, expressos em valores relativos as forças médias (%FM) de cada intensidade.

Figura 10. 1º quartil (A), mediana (B) e 3º quartil (C) para a intensidade inferior (Sub-iMFEL), equivalente (iMFEL) e superior a iMFEL (Supra-iMFEL), expressos em valores relativos as forças médias (%FM) da respectiva intensidade. Diferença significativa para: *Sub-iMFEL ($p < 0,05$).

A figura 11 apresenta os gráficos para os PN: contínuo (A), intermitente (B), em fuga (C) e em mergulho (D), caracterizados por meio da cinética do sinal de força.

Figura 11. Gráficos representativos selecionados de animais que apresentaram cinéticas do sinal de força com características dos nados: contínuo (A), intermitente (B), em fuga (C) e em mergulho (D).

8. DISCUSSÃO

Os principais objetivos da presente dissertação foram desenvolver um aparato para prática da natação atada, com captura direta da FN, para roedores e investigar a influência da DC no MNR por meio da comparação da análise do sinal de força entre animais controles (dieta padrão para roedores Labina Purina[®]) e tratados com dieta hiperlipídica (40% de gordura vegetal).

Para os parâmetros somáticos (tabela 1) foram observadas diferenças significativas entre os grupos, sendo que era esperado que a dieta hiperlipídica induzisse os animais que dela se alimentaram à obesidade. Dessa forma, o GO apresentou valores superiores para todas as variáveis analisadas exceto para DC, que revelou reduzidos valores em relação ao GC, demonstrando que a intervenção dietética foi eficaz em tornar os animais significativamente mais pesados, maiores e menos densos em relação ao GC.

A exemplo dos parâmetros somáticos, os parâmetros de composição química da carcaça expressos em valores absolutos (tabela 2) e relativos ao peso total da carcaça (tabela 3) revelaram, de forma direta, a maior quantidade de tecido adiposo do GO, por meio dos valores superiores de GVT e MG em relação ao GC. Quando expressos em valores relativos ao peso total da carcaça, foram observados valores superiores de MM e H₂O do GC em relação ao GO, justificando a maior DC desses animais devido a uma maior massa muscular relativa ao PC, embora o parâmetro Prot não tenha se mostrado significativamente superior nos animais GC em relação ao GO. Dessa forma, a análise geral dos parâmetros de composição química da carcaça justificou de forma direta os resultados encontrados para os parâmetros somáticos.

Foi realizada também a análise do perfil lipídico sérico dos animais (tabela 4) para constatação da eficiência da dieta na indução da obesidade no aspecto metabólico. Apesar das consequências somáticas da intervenção dietética terem sido claramente confirmadas, com relação ao perfil lipídico sérico, apenas o nível de colesterol sanguíneo do GO foi significativamente superior em relação ao GC enquanto, que o nível de LDL foi inesperadamente inferior. Dessa forma a combinação do método de redução de ninhada com dieta hiperlipídica resultou em uma maior concentração de colesterol circulante, enquanto os outros parâmetros analisados (triglicérides e lipídeos totais) demonstraram que, aparentemente, na condição de repouso na qual os animais foram eutanasiados, não houve mobilização das reservas adiposas acumuladas para o sangue.

Diferentemente de protocolos de tempo máximo de esforço utilizados em estudos clássicos do MNR (SCHEER et al. 1947; MCARDLE e MONTROYE 1966) o uso do lactato como marcador fisiológico de esforço, apesar de ser um procedimento invasivo, tem sido utilizado há décadas por cientistas da fisiologia do exercício, com a vantagem de uma maior precisão na determinação da intensidade e predominância metabólica do exercício, tanto em modelos experimentais humanos (MADER e HECK 1986; BILLAT et al. 2003) quanto animais (GOBETTO et al. 2001a; BILLAT et al. 2003; MANCHADO et al. 2005). A máxima fase estável de lactato é o protocolo padrão ouro na determinação da capacidade aeróbia e consiste em encontrar a intensidade de exercício associada à mais alta concentração de lactato na qual existe equilíbrio entre a produção e a remoção desse metabólito no sangue.

No presente estudo foram observadas uma máxima concentração estável de lactato de $3,67 \pm 0,98$ e $2,82 \pm 1,30$ mM para os GC e GO (figura 7), respectivamente. Em um estudo preliminar já submetido à publicação pelo nosso grupo de pesquisa (anexo), foi encontrada uma concentração de lactato associada à intensidade de MFEL de 4.81 ± 0.19 mM em animais com 120 dias de idade. Antes de iniciar uma discussão, tendo em vista a grande diferença entre as máximas concentrações estáveis de lactato encontradas nos diferentes trabalhos, cabe ressaltar que o estudo citado utilizou um protocolo de MFEL com 4 pontos ou 4 pausas de 30 segundos para coletas de amostras sanguíneas no 10º, 15º, 20º e 25º minuto de exercício, enquanto neste estudo foi utilizado um protocolo de MFEL simplificado com apenas 2 pontos ou duas pausas de 30 segundos para coletas de amostras sanguíneas no 10º e 30º minuto de exercício. É possível que essa diferença nos protocolos possa ser a causa da baixa concentração de lactato encontrada em ambos os grupos desse estudo.

Na hipótese de uma possível protocolo dependência da MFEL, poderíamos especular que quanto maior o número de pausas, obviamente mais intermitente torna-se o esforço e maior é a concentração de lactato que pode ser mantida com uma variação menor do que 1 mM durante os 20 minutos finais da atividade. Isso seria possível devido aos vários curtos períodos de recuperação passiva, os quais os animais são submetidos durante as coletas das amostras sanguíneas, suficientes para reduzir significativamente a concentração sanguínea de lactato através da remoção por sítios oxidativos via metabolismo aeróbio. No entanto ainda são necessários mais estudos que foquem o tema para investigar os efeitos de diferentes protocolos na determinação da máxima concentração estável de lactato.

A carga de iMFEL do GC expressa em valores absolutos foi significativamente inferior ao GO (figura 8A), no entanto quando somado os valores de PH as cargas de iMFEL+PH não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Essa é uma forte evidência da influência da DC na determinação da intensidade de exercício. As concentrações de lactato não diferiram significativamente entre os grupos e a associação dessas concentrações às cargas sustentadas durante o exercício determinam o potencial aeróbio dos animais. Caso o esforço para flutuação (PH) não fosse considerado, o GC teria capacidade aeróbia subestimada em relação ao GO, pois teve a iMFEL significativamente reduzida em função de sustentar uma maior DC durante a natação.

Uma vez que, para uma mesma carga absoluta, animais mais pesados levam vantagem em relação a animais menores, existe a necessidade de relativizar a carga de exercício em função do PC, igualando as condições e possibilitando comparações entre animais de diferentes grupos. Quando as cargas foram relativizadas pelo PC (tabela 8B) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tanto para iMFEL quanto para iMFEL+PH, mas vale destacar o alto desvio padrão encontrado, o que pode ter inibido uma potencial diferença estatística entre os grupos. Nesse contexto, a exemplo do que aconteceu com o carga expressa em valores absolutos, os animais do GC obtiveram maiores valores de carga após ter sido acrescentado o esforço individual para a flutuação à iMFEL.

A relativização das cargas pelo PH (figura 8C) cria um parâmetro que possibilita a visualização da influência da DC sobre a intensidade do exercício uma vez que este apresenta uma alta correlação negativa com o PH e a DC. Nesse contexto o GC apresentou valores significativamente inferiores ao GO tanto para iMFEL isolada quanto para iMFEL+PH, o que era esperado, uma vez que o GC possui valores significativamente maiores tanto de PH quanto de DC. Esses resultados corroboram com o estudo citado anteriormente (Apêndice A) que encontrou relações similares entre as cargas de iMFEL e iMFEL+PH expressas em valores absolutos e relativos ao PC e PH em animais de idades diferentes (90, 120 e 210 dias).

Dentre os valores de correlação de Pearson entre os parâmetros somáticos (tabela 5) vale destacar mais uma vez a perfeita correlação entre PC e VC, resultado já encontrado anteriormente (Apêndice A) quando foram determinados os VC de animais sadios, sedentários, com 90, 120 e 210 dias de idade. Isso demonstra que a intervenção dietética apesar de tornar os animais fisicamente mais pesados, maiores e menos densos não afetou a relação entre PC e VC. O IL

apresentou baixa correlação com o VC demonstrando não ser uma boa ferramenta preditora dessa variável. A DC apresentou baixa correlação com o PC, IL e VC demonstrando que é mais dependente do PH, haja vista os elevados valores de correlação entre esses parâmetros.

Entre os parâmetros de composição química da carcaça foram encontradas altas correlações (tabela 6) entre todos os parâmetros exceto para a variável H₂O expressa em valor absoluto e Prot expressa em valor absoluto e relativo ao peso da carcaça. As altas correlações negativas dos parâmetros associados a lipídeos (GVT, MG) com a H₂O expressa em valor relativo ao peso da carcaça podem ser justificadas por ser o tecido adiposo hidrofóbico. No entanto, não foram encontradas boas correlações para Prot expressa em valor absoluto ou relativo ao peso da carcaça, provavelmente devido a não haver diferenças significativas entre os grupos para esse parâmetro tanto em valor absoluto quanto relativo ao peso da carcaça (tabelas 2 e 3).

Na tabela 7 a carga de iMFEL expressa em valor relativo ao PC apresentou alta e boa correlação com as cargas de iMFEL expressas em valor absoluto e relativo ao PH respectivamente. O mesmo pode ser observado para a carga iMFEL+PH expressa em valor relativo ao PC que apresentou alta correlação com a carga de iMFEL+PH expressa em valor absoluto. Esses resultados confirmam que a relativização da carga pelo PC mantém a tendência encontrada para as cargas absoluta e relativa ao PH, demonstrando que a igualdade estatística verificada entre grupos para as cargas de iMFEL e iMFEL+PH expressas em valores relativos ao PC não devem ser interpretadas como totalmente verdadeiras, uma vez que houve diferença significativa entre os grupos para as cargas de iMFEL e iMFEL+PH expressas em valor absoluto e relativo ao PH.

Na tabela de associação entre os parâmetros somáticos e de composição química da carcaça (tabela 8), destaca-se as variáveis GVT expressas em valor absoluto e relativo ao peso da carcaça que apresentaram boa correlação significativa com todas as variáveis somáticas analisadas, inclusive com a DC. Por outro lado, a variável PH apresentou baixos valores de correlação com todos os parâmetros de composição química da carcaça, significativos apenas para as variáveis MG expressa em valor relativo ao peso da carcaça e GVT expressa em valor absoluto e relativo ao peso da carcaça. Dessa forma, podemos deduzir que a GVT é o parâmetro que tem maior influência sobre os parâmetros somáticos, inclusive sendo responsável quase que exclusivamente pelo PH.

Os valores de correlação entre os parâmetros somáticos e as cargas de iMFEL e iMFEL+PH expressas em valores absolutos e relativos ao PC e PH (tabela 9) apresentaram baixos valores de correlação, exceto entre as variáveis DC e a carga de iMFEL+PH expressa em valor relativo ao PC e alguns resultados já esperados. Uma vez que as variáveis PH e DC são altamente associadas entre si, foram encontrados os maiores valores de correlação para o PH e DC com as cargas de iMFEL e iMFEL+PH relativas ao próprio PH. No geral, pode-se dizer que os parâmetros somáticos não são bons preditores do desempenho no MNR.

Dentre as associações entre os parâmetros de composição química da carcaça e as cargas de iMFEL e iMFEL+PH expressas em valores absoluto e relativos ao PC e PH (tabela 10) pode-se destacar a variável Prot, expressa em valor relativo ao peso da carcaça que apresentou elevada correlação negativa com as cargas de iMFEL expressas em valores absoluto e relativos ao PC e PH. Esse pode ser um indício de que o potencial para o exercício em meio líquido é inversamente proporcional ao tamanho da massa muscular por essa ser diretamente proporcional à DC. Assim, animais com maior massa muscular são mais densos e por isso tem seu desempenho prejudicado no MNR quando o esforço individual para flutuação não é considerado. No entanto, não foram encontradas associações entre a variável Prot, tanto expressa em valor absoluto quanto relativo ao peso da carcaça, com as variáveis DC e PH para confirmar essa hipótese. Ainda dentro desse contexto, quando as cargas de iMFEL expressas em valor absoluto e relativo ao PC e PH são “corrigidas” pelo acréscimo do esforço individual para flutuação as altas correlações negativas e significativas encontradas com a variável Prot relativa ao peso da carcaça não são mais observadas, o que parece ser mais um indício a favor da idéia de que a DC tem um importante papel na determinação da intensidade do exercício no MNR.

As médias dos picos mínimos e máximos de força expressas em percentual relativo à média da respectiva intensidade foram diretamente e inversamente proporcionais à intensidade do exercício, respectivamente (figura 9). Reforçando essa evidência, a média dos desvios padrões de cada segundo diminuíram em função do aumento da intensidade de exercício, demonstrando que a sobrecarga parece influenciar na amplitude do sinal. Quando se exercitam de modo contínuo em intensidades mais altas os animais parecem apresentar uma manutenção mais precisa da intensidade de exercício em relação a intensidades mais baixas. Mais estudos deverão ser realizados visando investigar melhor essas características que são extremamente interessantes ao MNR.

Já a dispersão dos pontos parece não diferir em função da intensidade de exercício, como demonstrado pelos valores de 1º, 2º e 3º quartis relativos à força média da respectiva intensidade que no geral não diferiram entre as intensidades analisadas (figura 10).

O modelo de natação atada permitiu a identificação da ocorrência de diferentes PN por meio da análise da cinética do sinal de força. O PNC (figura 11A) parece ser dentre todos os PN o mais confortável para o animal, uma vez que parece estar associado a intensidades inferiores à iMFEL e é caracterizado pela manutenção constante do sinal e do animal na superfície quase que invariavelmente durante todo o tempo de exercício, sem alterar o ciclo respiratório. Já o PNI (figura 11B) parece estar associado a intensidades superiores à iMFEL ou mais precisamente próximos a exaustão e é caracterizado pela oscilação da FN devido ao rato alternar períodos de esforço com breves períodos de descanso passivo, influenciando no ciclo respiratório. O PNF (figura 11C) é caracterizado pelo excesso da força de propulsão realizada pelo animal, muito acima da necessária para se manter na superfície, podendo causar fadiga precoce. A incidência do nado em fuga parece ser maior nos primeiros dias de teste e em animais não adaptados ao meio líquido. O PNM é caracterizado pelo mergulho voluntário e de caráter exploratório do animal em direção ao fundo do tanque onde permanece em apnéia por alguns segundos antes de retornar a superfície e sua incidência é maior apenas nos primeiros dias de teste.

Estas observações fazem parte apenas do início de uma nova linha de investigação da experimentação animal, sendo que ainda existem muitas questões a serem respondidas. Apesar dos avanços em relação à identificação dos PN, ainda serão necessárias múltiplas investigações a cerca de estratégias para reduzir diferenças e homogeneizar o comportamento dos animais em testes e treinamentos utilizando natação. Esta foi a primeira vez que foi possível utilizar a análise da cinética do sinal de força na avaliação e provavelmente ainda seja possível aperfeiçoar os métodos de interpretação dos dados, uma vez que estes estão numa fase inicial de entendimento. Uma vez que o modelo de nado atado em ratos se mostrou viável para tais análises, futuros estudos deverão centrar esforços no sentido de se verificar alterações no PN em situações de transição metabólica aeróbia/anaeróbia, o que poderá servir para determinação, por exemplo, do limiar anaeróbio, sem a necessidade de procedimentos invasivos (coletas de sangue) ou de câmaras de espirometria para a determinação do VO_2 e VCO_2 .

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da redução de ninhada e dieta hiperlipídica foi possível induzir aumento do PC e VC, além da redução da DC dos animais. No entanto o aumento da quantidade de tecido adiposo refletiu apenas em maior concentração de colesterol a nível sérico. As avaliações de animais controles e obesos no teste de MFEL revelaram a influência significativa da DC na determinação das cargas de exercício, principalmente quando as cargas foram expressas em valores absolutos. Estudos que fazem uso do MNR, principalmente de caráter longitudinal, com avaliações transversais ou estudos que fazem uso de intervenções que podem influenciar a composição corporal dos animais (como dietéticas, patológicas e níveis de atividade física) podem ter os resultados alterados caso não seja considerado o esforço individual para flutuação. O modelo de natação atada para ratos permitiu a investigação de parâmetros estatísticos do sinal, que revelaram que a amplitude parece variar em função da intensidade, mas a dispersão dos pontos não. Além disso a análise visual da cinética da força permitiu caracterizar 4 PN bem distintos e especular sobre os motivos e implicações da incidência de cada um. Dessa forma, animais que apresentem um PN que influencie na avaliação, como o PNI, PNF e o PNM, devem ser excluídos da amostra. Talvez seja possível identificar a transição metabólica aeróbia/anaeróbia por meio da análise das mudanças dos parâmetros estatísticos e visuais do sinal de força. Atualmente, é provável que a natação seja o melhor ergômetro para avaliação das capacidades físicas de modelos animais experimentais, caso as constatações que limitam o MNR encontradas na literatura e levantadas no presente estudo sejam superadas.

10. CONCLUSÕES

O aparato desenvolvido mostrou-se eficaz para aplicação do modelo de natação atada em ratos. Além disso foi possível avaliar a capacidade aeróbia dos animais por meio do teste de MFEL em natação atada e monitorar em tempo real a FN durante todo o tempo de esforço dos animais de ambos os grupos.

A utilização da pesagem hidrostática para quantificar o esforço individual para flutuação permitiu demonstrar influência significativa da DC na determinação da carga em natação, ao comparar animais controles e obesos.

O modelo de natação atada permitiu investigar características de PN tanto por meio da análise visual da cinética do sinal força quanto pelo tratamento estatístico dos dados.

11. REFERÊNCIAS

- de Araujo GG, Papoti M, Manchado FB, Mello MAR, Gobatto CA.** Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A*. 148: 888–892, 2007.
- de Araujo GG, Araújo MB, D'Angelo RA, Manchado FB, Mota CSA, Ribeiro C, Mello MAR.** Máxima fase estável de lactato em ratos obesos de ambos os gêneros. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 15: 46-49, 2009.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, and Holloszy JO.** Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*. 16: 1879–1886, 2002.
- Baker MA, Horvath SM.** Influence of water temperature on oxygen uptake by swimming rats. *J. Appl. Physiol.* 19: 1215-1218, 1964a.
- Baker MA, Horvath SM.** Influence of water temperature on heart rate and rectal temperature of swimming rats. *Am. J. Physiol.* 207: 1073-1076, 1964b.
- Behnke AR, Wilmore JH.** Evaluation and regulation of body build and composition. *Englewoods Cliffs*. Prentice-Hall, 1974.
- Beneke R.** Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold and maximal lactate steady state in rowing. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 27: 863-7, 1995.
- Beneke R.** Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *Eur J Appl Physiol*. 89: 95-9, 2003.
- Bernardis LL, Petterson BD.** Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*. 40: 527-28, 1968.
- Billat VL, Sirvent P, Py Guillaume, Koralsztein JP, Mercier J.** The Concept of Maximal Lactate Steady State. *Sports Med*. 33 (6): 407-426, 2003.
- Brooks GA.** Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc*. 32: 790-9, 2000.
- Brooks GA.** Lactate: glycolytic product and oxidative substrate during sustained exercise in mammals-the 'lactate shuttle.' In: Gilles R, editor. *Comparative Physiology and Biochemistry: Current Topics and Trends*, vol. A. Respiration-Metabolism-Circulation. *Berlin (Germany): Springer*. 208-18, 1985.

- Buskirk ER.** Underwater weighing and body density: a review of procedures. In: Brozek J, Henschel A, editors. Techniques for measuring body composition. *Washington DC: National Academy of Science.* 90-105, 1961.
- Camasta S, Manco M, Mari A, Baldi S, Gastaldelli A, Greco AV, Mingrone G, Ferrannini E.** Beta-cell function in morbidly obese subjects during free living: long-term effects of weight loss. *Diabetes.* 54: 2382-9, 2005.
- Connett RJ, Honig CR, Gayeski TEJ, Brooks GA.** Defining hypoxia: a systems view of VO_2 , glycolysis, energetic, and intracellular PO_2 . *J Appl Physiol.* 68: 833-842, 1968.
- Cox RH, Hubbard JW, Lawler JE, Sanders BJ, and Mitchell VP.** Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. *J Appl Physiol.* 58: 1207–1214, 1985.
- Dahms WT, Glass AR.** Correlation of percent body fat with body specific gravity in rats. *J. Nutr.* 112: 398-400, 1982.
- Dawson CA, Horvath SM.** Swimming in small laboratory animals. *Med Sci Sports.* 2: 51-78, 1970.
- Dawson CA, Roemer RB, Horvath SM.** Body temperature and oxygen uptake in warm- and cold-adapted rats during swimming. *J Appl. Physiol.* 29(2): 150-154, 1970.
- Dawson CA, Nadel ER, Horvath SM.** Cardiac output in the cold-stressed swimming rat. *Am. J. Physiol.* 214(Z): 320-325, 1968.
- Engel RC, Jones JB.** Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD^+ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. *Analytical Biochemistry.* 88: 475-484, 1978.
- Feyder, S.** Fat formation from sucrose and glucose. *J. Nutr.* 9: 457-468, 1935.
- Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ:** Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol.* 260: R1104-R1113, 1991.
- Flaim SF, Minter WJ, Clark DP, and Zelis R.** Cardiovascular response to acute aquatic and treadmill exercise in the untrained rat. *J Appl Physiol.* 46: 302–308, 1979.
- Forsyth HL, Sinning WE.** The anthropometric estimation of body density and lean body weight of male athletes. *Med. Sci. Sports.* 5(3): 174-80, 1973.
- Frisch, R. E.; Hegsted, D. M.; Yoshinaga, K.** Carcass components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: Body water, protein, and fat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74: 379-383, 1977.

- Gnaedinger RH.** Estimation of Density of Live Pigs by Air Displacement and Helium Dilution Techniques (Ph.D. thesis). *East Lansing: Michigan State Univ.* 1962.
- Gobatto, CA, Kokubun, E, Sibuya, CY, Mello MAR.** Efeitos da desnutrição proteicocalórica 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 CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubun E.** Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A.* 130: 21-27, 2001a.
- Gobatto CA, Sibuya CY, Azevedo JRM, Luciano E, Kokubun E, Mello MAR.** Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos wistar. *Motriz.* jan-jun; vol. 7, nº1: s57-s62, 2001b.
- Gobatto CA, Mello MAR, Souza CT, Ribeiro IA.** The monosodium glutamate (MSG) obese rat as a model for the study of exercise in obesity. *Molecular Pathology and Pharmacology.* 111: 1-4, 89-102, 2002.
- Grewal T, Schemmel R, Cress CE, Mickelsen O.** Prediction of total body fat in rats from individual fat depot weights. *Growth.* 37: 111-126, 1973.
- Harri M, Kuusela P.** Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiologica Scandinavica.* 126: 189-197, 1986.
- Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W.** Justification of the 4-mmol/L threshold. *International Journal of Sports Medicine.* 6: 117-130, 1985.
- Hill AV, Long CNH, Lupton H.** Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen. Part VI. The oxygen debt at the end of exercise. *Proc R Lond B Biol Sci.* 97: 127-137, 1924.
- Hix VM, Pearson AM, Reineke EP,** Specific gravity of human subjects by air displacement and helium dilution. *J. Appl. Physiol.* 19: 955–958, 1964.
- Hohl R, Oliveira RB, Macedo DV, Brenzikofer R.** Apparatus for measuring rat body volume: a methodological proposition. *Journal of Applied Physiology.* 102: 1229-1234, 2007.
- Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Tanabe T, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, Sakai S, Ohmori H, Matsuda M, and Yamaguchi I.** Aging-induced decrease in the PPAR- α level in hearts is improved by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283: H1750–H1760, 2002.

- Jones TE, Baar K, Ojuka E, Chen M, and Holloszy JO.** Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284: E96–E101, 2003.
- Key J.** Relationship between load and swimming endurance in humans. *Res Quart.* 33: 559-565, 1962.
- Kindermann W, Simon G, J Keul.** The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. *Eur J Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 42, 25-34, 1979.
- Kodama AM, Pace N.** A simple decompression method for in vivo body fat in small animals. *J. Appl. Physiol.* 18: 1272–1276, 1963.
- Kodama, A. M.** In vivo and in vitro determination of body fat and body water in the hamster. *J. Appl. Physiol.* 3J: 218-222, 1971.
- Lafontaine TP, Londeree BR, Spath WK.** The maximal steady state versus selected running events. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 13: 190-2, 1981.
- Leblanc J, Dussault J, Lupien D, and Richard D.** Effect of diet and exercise on norepinephrine-induced thermogenesis in male and female rats. *J Appl Physiol* 52: 556–561, 1982.
- Lukaski, H. C. et al.** Validity of the tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *Journal of Applied Physiology.* 60: 1327-32, 1986.
- Lohman TG.** Exercise training and body composition in childhood. *Can. J. Sport. Sci.* Dec; 17(4): 284-7, 1992.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry.* 193: 265-75, 1951.
- Mader A, Heck H.** A theory of the metabolic origin of anaerobic threshold. *Int. J. Sports Med.* 7: 45-46, 1986.
- Marmo MR, Nunes MT, Volpato CB, Kettelhut IC, Hell NS, Lima FB, Dolnikoff M.** Reduced growth hormone mRNA levels in 28-d-old MSG rat impair protein and lipid metabolism. *European J. Physiol.* 427: R29, 1994.
- Marques APJ, Bion FM, Guimarães F, Campos FACS.** Influência de dietas à base de alimentos regionais e da natação em ratos de meia idade. *Rev. Paul. Educ. Fís.* jan./jun; 17(1): 64-73, 2003.

- Miller HC, Darrow DC.** Relation of serum and muscle electrolyte, particularly potassium, to voluntary exercise. *Am. J. Physiol.* 132: 801, 1941.
- Mello MAR, Souza CT, Braga LR, Santos JW, Ribeiro IA, Gobatto CA.** Glucose Tolerance and Insulin Action in Monosodium Glutamate (MSG) Obese Exercise-trained Rats. *Physiol. Chem. Phys. e Med.* 33: 63-71, 2001.
- Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata MA, Abdala DSP, Hirata RDC.** Métodos de Bioquímica Clínica. *Pancast.* São Paulo, 1990.
- Rathbun EN, Pace N.** The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content. *J. Biol. Chem.* 158: 685–691, 1945.
- Richardson RS, Elizabeth AN, John SL, Peter DW.** Lactate efflux from exercising human skeletal muscle: role of intracellular PO₂. *J. Appl. Physiol.* 85(2): 627–634, 1998.
- Richter CP.** On phenomenon of sudden death in animals and man. *Psychosom Med.* 19: 191-98, 1957.
- Rogers P, Webb GP.** Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br. J. Nutr.* 43: 83–86, 1980.
- Román MC, Torres SP, Bellido MC.** Bases físicas del análisis de la impedância bioelétrica. *Vox Paediatr.* 7(2): 139- 43, 1999.
- Siri, WE.** Apparatus for measuring human body volume. *Rev. Sci. Instrum.* 27: 729–738, 1955.
- Stone MH, Rush ME, Lipner H.** Responses to intensive training and methandrostenolone administration. II. Hormonal, organ weights, muscle weights and body composition. *Pflugers Arch.* 375: 147–151, 1978.
- Sturek ML, Bedford TG, Tipton CM, Newcomer L.** Acute cardiorespiratory responses of hypertensive rats to swimming and treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 57: 1328–1332, 1984.
- Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM.** Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 25:620-7, 1993.
- Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR.** Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 35: 1-6, 2002.
- Voltarelli FA, Nunes WMS, Santiago V, Pauli JR, Garcia DR, Romero C, Silva AS, Mello MAR.** Determinação do Limiar Anaeróbio em Ratas Obesas com Glutamato Monossódico (MSG). *Revista Logos.* 11: 84-93, 2003.

Walser M, Stein SN. Determination of specific gravity of intact animals by helium displacement: comparison with water displacement. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82: 774–777, 1953.

Wasserman K, McIlroy MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *Am. J. Cardiol.* 14: 844, 1964.

Waterlow JC, Mendes CB. Composition of muscle in malnourished human infants. *Nature.* v180: p1361-2, 1957.

Wilber CG. Influence of temperature on performance in guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 190(s): 457-458, 1957.

Wilber CG. Some factors which are correlated with swimming capacity in guinea pigs. *J Appl Physiol.* 14(2): 199-203, 1959.

Wilber CG, Hunn JB. Swimming of albino mice. *J Appl Physiol.* 15(a): 704-705, 1960.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO

INFLUENCE OF THE CORPOREAL SPECIFIC GRAVITY ON THE WORKLOAD
QUANTIFICATION OF DIFFERENT AGE RATS EVALUATED IN THE FORCED
SWIMMING MODEL

Ivan Gustavo Masselli dos Reis, Gustavo Gomes de Araujo, Claudio Alexandre Gobatto*

Department of Physical Education, Laboratory of Sport Applied Physiology, Sao Paulo
State University – UNESP, Av. 24A, 1515, Bela Vista, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

* Corresponding author: cgobatto@pq.cnpq.br

Abstract

Aim: In the forced swimming model for rats the animals with a lower body density have an intrinsic advantage that facilitate their floatability and implicate in less effort to keep itself on the water surface than the denser ones. The objective of this study was to verify the body density influence in the forced swimming for rats to improve the evaluation and to avoid intensity determination mistakes in this rodent ergometer. **Methods:** Forty *Wistar* rats aged 90, 120 and 210 days were used. All the animals had their body volumes and densities determined by hydrostatic weighing and were evaluated in the maximal lactate steady state test adapted to the forced swimming. **Results:** Significant body density differences ($p < 0.001$) among the ages were found and confirmed the influence on the workload quantification. Hydrostatic weighing values revealed that the older rats (120 and 210 days) were denser and performed higher ($p < 0.01$) absolute efforts to keep itself on the surface than the younger ones (90 days). It was found a not significant tendency to increase the maximal lactate steady state concentration in agreement with the increase of the age. **Conclusions:** In the future, studies that make use of the swimming model for rats must realize that the sedentary older *Wistar* rats could have their workloads underestimated and tend to present higher values of maximal stable lactate concentration than the sedentary younger. Thus, the body density could influence the individual aerobic capacity evaluation, meanly in longitudinal experiments in which the aging process might increase the mistakes.

Key words: forced swimming, body density, maximal lactate steady state.

Introduction

The exercise protocols and ergometers for animals must be accurate to simulate the physical stress conditions, which the study proposed to investigate (Pillis *et al.* 1993; Gobatto *et al.* 2001a, 2008; Voltarelli *et al.* 2002; Manchado *et al.* 2005; de Araujo *et al.* 2007). The forced swimming model (FSM) for rats reveled the occurrence of similar organic exercise replies to those found in humans (Gobatto *et al.* 2001a; Voltarelli *et al.* 2002; de Araujo *et al.* 2007). Since the rats are innately good swimmers when necessary, is possible to highlight the low cost, practicality and the sureness of the animal's maximal performance due to the need to avoid drowning as some of the advantages of FSM in relation to other ergometers.

In the FSM the animals swim vertically with loads attached to their back or tail to difficult their permanence on the water surface and to quantify different intensities of effort. Despite the great acceptance found in the literature such methodology could have a lack of precision once it ignore the animal's body density (BD), which could be an issue in the FSM (Scheer *et al.* 1947). It is evident that less dense animals have an intrinsic advantage that facilitate their floatability and implicate in less effort than the denser ones.

McArdle & Montoye (1966) found that the body weight (BW) increase is related to a worse performance in the all out swimming time, however this research was not concerned about the BD influence on the workload quantification. Since unpublished data of our investigation group showed significant BD differences among rats of different ages, we speculate that the denser animals could have their workloads underestimated in relation to less dense rats.

The impact of BD on the intensity regulation in the FSM still unknown, thus the main concern of this study was to verify the BD influence in the workload quantification by evaluating animals of 3 different ages. Thus, it is expected that after evidence and understanding the BD influence in this ergometer, it might be possible to improve the exercise intensity regulation, reflecting in more reliable results in the exercise physiology researches.

Material and methods

All experiments involving the animals were performed in accordance to the specific Brazilian resolutions on the Bioethics in Experiments with animals (law project number 93/08, approved in September 9th, 2008), that is in agreement to the guidelines of the American Society of Physiology (ASP) for research involving animals and to the European Convention for the protection of vertebrate animals used for Experimental and other scientific purposes.

Animals

Fourty male *rattus norvegicus* albinus (Wistar) with approximately 90 (n=10), 120 (n=16) and 210 (n=14) days old, mean weight of 470 ± 11 grams (mean $\pm$ sem), provided from the central vivarium of the Sao Paulo State University campus of Botucatu, were used. Through all the experiment the animals were kept in indoor environment, in collective polyethylene cages (maximum of 5 rats per cage), at environment temperature of 77° F and inverted photoperiod (light/dark) of 12/12 hours. The animals received commercial chow for rodents (Labina-Purina®)

and water *ad libitum*. The swimming tests were preceded by 5 minutes/day, 5 days/week, during 3 weeks of individual adaptation to the water environment initially consisting of keeping the animals in shallow water at 31°C (Harri & Kuusela 1986) with daily gradual rise of depth until the animal was unable to stand in contact with the tank bottom. It appears that adaptation reduces learn factors improving the reliability of the measure significantly (McArdle & Montoye 1966). The animals were divided in 3 experimental groups: G90, G120 and G210 with 90, 120 and 210 days of age respectively.

Body density determination

All the animals had their hydrostatic weight (HW) measured by hydrostatic weighing which is a method based upon the Arquimedes principle: a liquid immersed body undergoes a hydrostatic force of buoyancy that is evidenced by a weight difference that is equivalent to the dislocated liquid weight. The weighing was performed by a system developed specifically for the animal's model, composed of an acquisition data system (computer with software Hyperterminal from Windows XP[®]) and a high accuracy scale (BellMark 5000[®]) for the capture of data on a frequency of 9600 bits/s. Furthermore, a glass aquarium (35 cm length x 35 cm width x 50 cm height) and an animal support system that allows only the rat nose out of water during the weighing were used. With the intention of reducing the stress and to avoid animal's movement while measuring HW, the rats were sedated by injections of 75 µL of ketamina-xilasina for each 100 grams of BW and if necessary one more dose was administered for effect of maintenance. The sedated rats were first submerged in the water for removal of the air bubbles trapped in the hair to then they were hanging by the upper teethes with a ring connected to the accuracy scale. Thirty seconds of weighing values were captured and the mode value was considered as the animal HW. When there was more than one value of mode the mode closest to mean value was taken as HW.

The equation for the BV determination for humans (Behnke and Wilmore, 1974), adapted for the animal model is presented below. The body volume (BV) is equal to the difference between the body weight (BW) and the hydrostatic weight (HW), divided by water density (WD) (equation 1).

$$BV = (BW - HW) \div WD$$

Equation 1. Body Volume

The body density (BD) of the animals were obtained by the relationship between body weight (BW) and the body volume (BV) (equation 2).

$$BD = BW \div BV$$

Equation 2. Body Density

Maximal lactate steady state test

The tests were carried out 24 hours after BD determination and consisted of 3 to 5 constant efforts until reaching exhaustion or completing 25 minutes of exercise, with equivalent lead fish sinker weights of 3 to 7 %BW, placed inside small cloth tissue bags attached to the animal's back. The intensity was chosen at random sequence never repeated for the same rat and with intervals of 24 hours between each load (Gobatto *et al.* 2001a). The rats swam individually (Wilber 1959; Wilber & Hunn 1960) in cylindrical tanks (80 cm diameter × 120 cm depth) filled with water at 31±1 °C (Harri & Kuusela 1986), which are deep enough to prevent that the animal performs jumps during the test. Rats could not touch the bottom or hang on the sides and were supervised the entire swim time. The rat's total underwater stay during more than 10 seconds was taken as a parameter for exhaustion (Scheer *et al.* 1947; McArdle & Montoye 1966). Occasionally rats submerged at the bottom for several seconds, evidently seeking a means of escape. By careful observation it was not difficult to determine when submersion was due to exhaustion and when it was due to other factors (Miller & Darrow 1941). Blood samples of 25 µL were collected for lactate measurement from a cut at the distal end of the tail during rest, at the 10th, 15th, 20th, 25th minute of the test. Samples were collected using of heparinized capillary tubes and transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes containing 400 µL of trichloroacetic acid (4%) for posterior spectrophotometer enzymatic assay (Engel & Jones 1978). Thus, the individual maximal lactate steady state intensity (MLSSi) was the highest constant exercise associated to the highest blood lactate concentration in which blood lactate entrance was equal to the removal with an inferior variation of 1 mM between the 10th and the 25th minute of exercise (Mader & Heck 1986; Gobatto *et al.* 2001a; Billat *et al.* 2003; Manchado *et al.* 2005).

Workload reproducibility

Rats were submitted to the swim exercise wearing small fabric backpacks (figure 1A) containing lead fish sinkers (figure 1B) that must be sustained during all exercise time. The workload must be confectioned with a material that allows the reproducibility of the tests. Thus, several workload weights (figure 1B) were underwater weighted for verify the lead's HW. For instance, 10 grams of the lead weighted in the air had an underwater weight of 9.093 grams and an average density of 11.1169 g/cm^3 . Furthermore, due to the lead homogeneity it was found a perfect ($r^2=1.00$) and positive linear relationship with its dry weight. Also, the small backpacks (figure 1A) were of same size and cloth tissue, keeping always the same condition on each test.

Figure 1. Workload and backpack .

Measuring the body density influence in the forced swimming model

As the equation 3 demonstrates, the biological HW is a parameter that is BD dependent and represents the swimming effort that the rat must perform to keep itself on the water surface without any kind of workload. Determine the HW is equivalent to quantify the individual effort for fluctuation, therefore, the real rat effort is the combination of the individual MLSSi (described above) and his HW (MLSSi+HW). Different of the conventional researches of the forced swimming model that ignore the HW, it was created a “new method” of quantify the workload, which is BD concerned.

$$HW = BW - [(BW \div BD) \times WD]$$

Equation 3. Rat's hydrostatic weight

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed by the software Statistica 7.0 (StatSoft®). All variables had normal distribution (Shapiro-Wilks test) and were presented as mean $\pm$ standard error of mean. The variance tests among the body parameters, load values (MLSSi and MLSSi+HW) and blood lactate concentration in the MLSS test were performed by the one-way ANOVA and when necessary the Post-Hoc/Scheffé analyses was used. The pearson correlation analysis was used to verify the correlation among the variables.

Results

The somatic parameters presented significant differences among ages and increased in agreement with aging (table 1).

Table 1. Body weight (BW), hydrostatic weight (HW), body volume (BV) and body density (BD) values for all groups.

Age (days)	BW (g)	HW (g)	BV (cm ³)	BD (g/cm ³)
90 (n=10)	392 $\pm$ 7	10.24 $\pm$ 1	385 $\pm$ 7	1.0206 $\pm$ 0.0005
120 (n=16)	455 $\pm$ 12 [#]	16.85 $\pm$ 1 [*]	441 $\pm$ 12 [#]	1.0324 $\pm$ 0.0006 [#]
210 (n=14)	543 $\pm$ 11 ^{*•}	21.36 $\pm$ 1 ^{*♦}	525 $\pm$ 11 ^{*•}	1.0351 $\pm$ 0.0004 [*]

Significant difference to: ^{*}G90 (p<0.001), [•]G120 (p<0.001), [#]G90 (p<0.01), [♦]G120 (p<0.01).

The maximal stable blood lactate concentration values were of 4.11 $\pm$ 0.15, 4.81 $\pm$ 0.19 and 5.46 $\pm$ 0.18 mM for G90 (A), G120 (B) and G210 (C) respectively and there are no significant differences among the groups (figure 2).

Figure 2. Maximal blood lactate steady state concentration (mM) during rest, at the 10th, 15th, 20th and 25th minute of exercise for G90 (A), G120 (B) and G210 (C).

The MLSSi and MLSSi+HW workload expressed as absolute, percentage of body (%BW) and hydrostatic weight (%HW) value are presented in the table 2 and the figure 3.

Table 2. MLSSi and MLSSi+HW workload expressed as absolute, percentage of body (%BW) and hydrostatic (%HW) weight value for all groups.

Age (days)	MLSSi (g)	MLSSi (%BW)	MLSSi (%HW)	MLSSi+HW (g)	MLSSi+HW (%BW)	MLSSi+HW (%HW)
90	20.65±1.31	5.28±0.35	220.86±29.00	30.90±1.52	7.89±0.40	320.86±29.00
120	21.39±1.36	4.70±0.27	132.13±11.47*	38.23±1.53*	8.42±0.27	232.13±11.47*
210	24.41±1.50	4.51±0.28	118.08±9.17*	45.77±1.77*	8.47±0.37	218.08±9.17*

Significant difference to: * G90 (p<0.001), •G120 (p<0.05).

Figure 3. MLSSi and MLSSi+HW load in absolute (A), relative to body (B) and hydrostatic (C) weight. Significant difference to: *G90 ($p < 0.01$), *G120 ($p < 0.05$).

The values of pearson correlation among the somatic parameters and the MLSSi and MLSSi+HW workload expressed in absolute, percentage of body and hydrostatic weight value are presented in the table 3.

Table 3. Pearson correlation values among age (days), body weight (BW), hydrostatic weight (HW), body volume (BV), body density (BD) and the MLSSi and MLSSi+HW workload expressed in absolute (g), percentage of body (%BW) and hydrostatic (%HW) weight value.

	Age (Days)	BW (g)	HW (g)	BV (cm ³)	BD (g/cm ³)
MLSSi (g)	0,30	0,40 [•]	0,17	0,41 [•]	-0,02
MLSSi (%BW)	-0,23	-0,28	-0,30	-0,27	-0,24
MLSSi (%HW)	-0,44 [•]	-0,41 [•]	-0,76 [*]	-0,37 [•]	-0,78 [*]
MLSSi+HW (g)	0,67 [*]	0,71 [*]	0,77 [*]	0,69 [*]	0,57 [*]
MLSSi+HW (%BW)	0,14	-0,03	0,39 [•]	-0,06	0,53 [*]
MLSSi+HW (%HW)	-0,44 [•]	-0,41 [•]	-0,76 [*]	-0,37 [•]	-0,78 [*]

Significant correlation: ^{*}p<0.001, [•]p<0.05.

Discussion

The aim of this study was to verify whether the BD plays a significant role on the workload quantification in the FSM. Wistar rats of 3 different ages were evaluated to verify the morphologic changes caused by the aging process, which can possibly affect the BD and the MLSS test performance.

Significant differences among ages for BW, HW, BV and BD were found (table 1). The G90 presented significant lower values than the older groups for all somatic parameters. The correlations among age and the somatic parameters were meanly significant for BW ($r=0.81^*$), HW ($r=0.73^*$) and BV ($r=0.80^*$) confirming the aging process influence on the somatic characteristics of these animals. The BD presented an average correlation with age ($r=0.46^•$) and low with BW ($r=0.29$) and BV ($r=0.23$), showing it might be more dependent of the HW ($r=0.89^*$) than the age and others somatic parameters in male sedentary rats.

Voltarelli *et al.* (2003) adapted the lactate minimum test initially proposed by Tegtbur *et al.* (1993) to the swimming model for obese induced by monosodium glutamate female rats and evaluated the individual aerobic capacity. These authors verified that for the same relative (%BW) exercise intensity the obese animals performed lower efforts than the control groups. In a

similar study, Araujo *et al.* (2009) determined the maximal lactate steady state in control and obese rats of both genders and found for the obese groups higher workloads (%BW) associated to the MLSS than their respective control groups. In both studies this could be attributed to a possible lower BD of the obese groups allowing an easier fluctuation during the swimming exercise.

The animals from the G90 had lower BD influence on the workload quantification than the older groups because it presented the closest values to the water density (0.9963 g/cm^3). In addition to the higher BD values, the G210 presented higher HW than the G90 once it has a positive correlation with BD ($r=0.89^*$) and age ($r=0.73^*$).

Absolute MLSSi workload was not significant different among ages but when the HW was considered as workload (MLSSi+HW) the G210 had significant higher values than G90 ($p<0.01$) and G120 ($p<0.05$), evidencing the increase of the HW that occurs with aging process and the influence of the BD on the workload quantification.

Since the workload sustained by a small size rat probably will not represent the same effort for a larger one (Scheer *et al.* 1947) there is the need of relativize it. The conventional methodology to prescribe the workload was created to make an individual workload prescription compatible with the animal's work potential and uses a relative percentage of body weight (%BW) (Dawson & Horvath 1970; Harri & Kuusela 1986; Gobatto *et al.* 2001b) because it considers that the heavier rats have the highest exercise potentials and consequently they must perform the highest absolute efforts. However, McArdle & Montoye (1966) showed that the maximal swim time is negatively correlated with body weight ($r=-0.49$) for a same %BW workload and discussed that it would appear that as an animal increases in size the ability to swim with a set percentage of body weight is not maintained proportionately.

Although there are not significant differences, the older groups presented lower values of MLSSi relative to BW than the G90. When the HW was added to the MLSSi it could be observed the opposite result with the still not significant higher values of effort performed by the G210 and the lowest values assigned to the G90. Probably, the mean values of workload relative to %BW were not significant different among groups due to the high standard deviation found and the same could be expected of the maximal lactate steady state concentration (MLSSc).

It is possible that the minimum BD variations result in animals' floatability differences meanly in those studies in which experimental interventions could alter the body composition

(Mello *et al.* 2001; Gobatto *et al.* 2002; Voltarelli *et al.* 2003; Araujo *et al.* 2009). Scheer *et al.* (1947) proposed a method of BD homogenization by brass weights attached to the thorax with elastic bands to bring the specific gravity within the same range and reduced the physical capacity variability among rats for a test of fitness for exhausting work. Furthermore, for a BD homogenization was observed a small positive correlation between specific gravity and duration of swim, and a similar small correlation between body weight and duration of swim (Scheer *et al.* 1947).

In the present study, a similar average correlation between BD and the MLSSi+HW workload expressed as absolute and relative to %BW ($r=0.57^*$ and 0.53^* respectively) were found. Without considering the animal's fluctuation (MLSSi) these correlations were not observed ($r=-0.02$ and -0.24) and is possible to underestimate the aerobic capacity of the G210 mainly in relation to G90. Since the denser rats have to sustain a higher HW, after combine it with the MLSSi workload (MLSSi+HW) it was observed an absolute higher ($r=0.71^*$) and a relative to %BW lower negative ($r=-0.03$) correlation coefficient with the BW. This evidence was never demonstrated before in studies of the FSM, so could be a mistake to affirm that the BW increase is associated to a decline of the workload relative to %BW without verify the individual effort to fluctuation.

Within this framework, the animals from G120 and G210 performed the lowest efforts relative to the HW, which was expected once they had the highest values of HW and this relative workload showed high negative correlation with BD ($r=-0.78^*$). Thus, the workload expressed as %HW is a workload parameter “concerned” about BD for the FSM. Moreover, there are no significant differences between G120 and G210 %HW relative workload which shows that within this range of age there is a smaller influence of BD in exercise intensity than between 90 and 120 days old.

Blood lactate measurement is a precise and trustable tool for determine the metabolic characteristics of the exercise (Mader & Heck 1986; Gobatto *et al.* 2001a; Billat *et al.* 2003; Manchado *et al.* 2005). Thus the maximal lactate steady state (MLSS) test, which is considered as the gold standard protocol for the aerobic capacity determination, adapted to swimming rats (Gobatto *et al.* 2001a) was used instead the classics tests to exhaustion (Scheer *et al.* 1947; McArdle & Montoye 1966). Heck *et al.* (1985) found for humans that the blood lactate concentration of 4 mM was equivalent to the transition in which the energy contribution provide

by the anaerobic metabolism surpasses the energy provided by the aerobic. The MLSS is the highest blood lactate concentration, in which there is an equilibrium between the production and the removal of blood lactate beside the workload associated to this intensity (Gobatto *et al.* 2001a; Billat *et al.* 2003; Manchado *et al.* 2005). By definition the MLSS is reached when the highest blood lactate concentration stabilizes with a maximal variation of 1mM during at least 20 minutes of constant intensity exercise (Mader & Heck 1986).

Beneke *et al.* (2001, 2003) verified that the MLSSc could be protocol dependent due to the different replies observed when they compared upper and lower limbs exercise. The MLSSc seems to be related to the power output per unit of muscle mass involved in the exercise. In the exercise protocols for rats the MLSS also seems to be protocol dependence (Manchado *et al.* 2006) once the MLSSc was 5.5 mM in the FSM (Gobatto *et al.* 2001a) and 3.9 mM in running rats (Manchado *et al.* 2005). Here, the mean MLSSc were of 4.11, 4.81 and 5.46 mM for rats of 90, 120 and 210 days of age respectively, obtained in a deep swimming tank. The results were in agreement with the protocol dependent hypothesis and showed a not significant tendency to increase the maximal blood lactate concentration in agreement with the increase of age. Despite of the visual differences among the groups for the MLSSc, the high intra-group standard deviation not allowed significant differences ($p < 0.05$) among the groups in this parameter. In a study about the MLSS and the aging process in humans (Mattern *et al.* 2003) the authors observed a decrease of the MLSSc and the intensity relative to the maximal oxygen uptake in agreement with the aging process but not found differences in the citrate synthase activity or the myosin heavy chain isoform profile among young, middle-age and older athletes. However the decline of the MLSSc with aging process was not observed in rats between 90 and 210 days old whereas not significant differences among groups were found.

Concluding remarks and perspectives

The wide standard deviations values for the individual workload and blood lactate concentration found in this study warn to the need of performing the individual evaluation of the aerobic capacity. The significant differences of BD among groups revealed the influence on the effort intensity in the FSM. Therefore, studies that going to make use of the SMR must prioritize the individual assessment of the aerobic capacity instead of the workload generalization due to the wide variation of workload among animals found in the MLSS test, mainly in longitudinal

studies with interventions that can modify the animal BD or carried out during the body grow of the animals, which could lead to an increase of the HW. In studies which the individual assessment of the aerobic capacity is unviable the authors must realize that without consider the animals fluctuation the older sedentary animals tend to present similar absolute and lower relative to a %BW workload values than younger rats due to their higher HW. To minimize the growth effect on the BD, studies must use 120 to 210 days animals instead 90 days old. Further studies are needed to evidence the impact of BD in the SMR using obese and trained animals.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Proc. 06/61189-0). Grateful acknowledgment is given to José Roberto Rodrigues da Silva, Eduardo Custódio and Clarice Yoshiko Sibuya for the technical assistance and to Prof. Dr. René Brenzikofer for the accessory.

References

- Araujo G.G., Araújo M.B., D'Angelo R.A., Manchado F.B., Mota C.S.A., Ribeiro C., Mello M.A.R. 2009. Máxima fase estável de lactato em ratos obesos de ambos os gêneros. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **15**, 46-49.
- Behnke A.R., Wilmore J.H. 1974. Evaluation and regulation of body build and composition, *Englewoods Cliffs*, Prentice-Hall.
- Beneke R., Leithauser R., Hutler M. 2001. Dependence of the maximal lactate steady state on the motor pattern of exercise. *British Journal of Sports Medicine* **35**, 192-196.
- Beneke R. 1995. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold and maximal lactate steady state in rowing. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **27**, 863-863.
- Beneke R. 2003. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *Eur J Appl Physiol* **89**, 95-99.

- Billat V.L., Sirvent P., Py G., Koralsztein J.P. 2003. The concept of maximal lactate steady state. *Sports Med* **33** (6), 407-426.
- Dawson C., Horvath S.M. 1970. Swimming in small laboratory animals. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **2**, 51-78.
- Engel P.C., Jones J.B. 1978. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. *Anal Biochem* **88**, 475-485.
- Gobatto C.A., Mello M.A.R., Manchado-Gobatto F.B., Papoti M.A., Voltarelli F.A., Contarteze R.V.L., de Araújo G.G. 2008. Avaliações fisiológicas adaptadas a roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte* **7** (1), 137-147.
- Gobatto C.A., Mello M.A.R., Souza C.T., Ribeiro I.A. 2002. Monosodium glutamate obese rat as model for the study of exercise in obesity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **111**, 89-102.
- Gobatto C.A., Mello M.A.R., Sibuya C.Y., Azevedo J.R.M., Santos L.A., Kokubum E. 2001a. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **130**, 21-27.
- Gobatto C.A., Sibuya C.Y., Azevedo J.R.M., Luciano E., Kokubun E., Mello M.A.R. 2001b. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos wistar. *Motriz* **7**. (1), s57-s62.
- Harri M., Kuusela P. 1986. Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiologica Scandinavica* **126**, 189-197.
- Heck H., Mader A., Hess G., Mucke S., Muller R., Hollmann W. 1985. Justification of the 4-mmol/L threshold. *International Journal of Sports Medicine* **6**, 117-130.
- Mader A., Heck. H. 1986. A theory of the metabolic origin of anaerobic threshold. *Int J Sports Med* **7**, 45-46.
- Manchado F.B., Gobatto C.A., Contarteze R.V.L., Papoti M., Mello M.A.R. 2005. Maximal Lactate steady state in running rats. *Jornal of Exercise Physiology Online* **8** (8), 29-35.
- Manchado F.B., Gobatto C.A., Contarteze R.V.L., Papoti M., Mello M.A.R. 2006. Máxima fase estável é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **12** (5), 259-262.

- Mattern C.O., Margaret J.G., Darrin L.B., Timothy E.K., Kenneth W.H., Steven T.D. 2003. Maximal lactate steady state declines during the aging process. *J Appl Physiol* **95**, 2576–2582.
- McArdle W.D., Montoye H.J. 1966. The reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J Appl Physiol* **21**, 1431-1434.
- Mello M.A.R., Souza C.T., Braga L.R., Santos J.W., Ribeiro I.A., Gobatto C.A. 2001. Glucose Tolerance and Insulin Action in Monosodium Glutamate (MSG) Obese Exercise-trained Rats. *Physiol Chem Phys Med* **33**, 63-71.
- Miller H.C., Darrow D.C. 1941. Relation of serum and muscle electrolyte, particularly potassium, to voluntary exercise. *Am J Physiol* **132**, 801-809.
- Scheer B.T., Dorst S., Codie J.F., Soule D.F. 1947. Physical capacity of rats in relation to energy and fat content of the diet. *Am J Physiol* **149**, 194-202.
- Tegtbur U., Busse M.W., Braumann K.M. 1993. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **25**, 620-627.
- Voltarelli F.A., Gobatto C.A., Mello M.A.R. 2002. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **35**, 1-6.
- Voltarelli F.A., Nunes W.M.S., Santiago V., Pauli J.R., Garcia D.R., Romero C., Silva A.S., Mello M.A.R. 2003. Determinação do Limiar Anaeróbio em Ratas Obesas com Glutamato Monossódico (MSG). *Revista Logos* **11**, 84-93.
- Wilber C.G., Hunn J.B. 1960. Swimming of albino mice. *J Appl Physiol* **15**(4), 704-705.
- Wilber C.G. 1959. Some factors which are correlated with swimming capacity in guinea pigs. *J Appl Physiol* **14**(2), 199-203.